

Université de Sherbrooke

**MESURES DES CONCENTRATIONS TOTALES EN CALCIUM ET EN ZINC AU
NIVEAU DE TISSUS BIOLOGIQUES (CERVEAU ET MUSCLES
SQUELETTIQUES)**

Par
Fatou Touré
Programme de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M. Sc.) en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Juin, 2018

Membres du jury d'évaluation
Paul C. Pape Département de pharmacologie-physiologie
Dimitri Ryczko Département de pharmacologie-physiologie
Guylain Boulay Département de pharmacologie-physiologie

© Fatou Touré, 2018

Œuvre dédiée à mon père. Merci pour tout.

RÉSUMÉ

Mesures des concentrations totales en calcium et en zinc au niveau de tissus biologiques (cerveau et muscles squelettiques)

Par

Fatou Touré

Programme de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de Maîtrise ès sciences (M.Sc.) en Physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Lambole et al., 2015 (*Journal of General Physiology* 145(2):127-153) ont développé une nouvelle méthode de mesure des concentrations totales en calcium dans le muscle squelettique entier ($[Ca_T]$). Cette technique est basée sur les propriétés du BAPTA dont le spectre d'absorbance UV est modifié en fonction de la quantité de Ca^{2+} liée (Tsien, 1980; *Biochemistry*, 19(11): 2396-2404). Qian et Colvin, 2015 (*Journal of General Physiology* 147(1): 95-102) ont souligné que la liaison du BAPTA au Ca^{2+} n'était pas sélective et que d'autres divalents, notamment le Zn^{2+} , étaient également capturés lors de l'analyse; ajoutant ainsi une proportion masquée de zinc à la valeur de calcium déterminée. Nous décrivons le développement d'une méthode basée sur celle de Lambole et al., 2015 permettant à présent de supprimer la compétition qui existait entre le calcium et le zinc concernant les sites de liaison du BAPTA essentiellement grâce à l'introduction du TPEN, chélateur présentant une grande affinité pour le Zn^{2+} comparativement au Ca^{2+} . Nous nous sommes ensuite intéressés à l'application de la méthode nouvellement développée à des régions spécifiques du cerveau impliquées dans plusieurs pathologies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer ou de Huntington, dans le but de déterminer les $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ associées en conditions physiologiques, et ceci parallèlement à l'étude de muscles squelettiques. Chez la souris, les valeurs de $[Ca_T]$ (mmoles/kg, (N, S.E.M.)) ont été déterminées dans les bulbes olfactifs: 2,03 (24, 0,2), le cervelet: 0,9 (12, 0,05), l'hippocampe: 1,18 (24, 0,07), le striatum: 1,23 (24, 0,14), le cortex cérébral: 0,9 (12, 0,02), l'EDL: 3,28 (12, 0,14) et le soleus: 3,42 (12, 0,25). Les valeurs de $[Zn_T]$ (mmoles/kg, (N, S.E.M.)) ont également été mesurées dans les mêmes tissus biologiques, précisément les bulbes olfactifs: 0,59 (24, 0,13), le cervelet: 0,26 (12, 0,09), l'hippocampe: 0,62 (24, 0,06), le striatum: 0,51 (24, 0,04), le cortex cérébral: 0,3 (12, 0,04), l'EDL: 0,25 (12, 0,06) et le soleus: 0,56 (12, 0,1). En résumé, le contenu total en calcium déterminé est significativement plus important dans les muscles squelettiques étudiés comparativement au cerveau d'une part et d'autre part, le contenu total en zinc, spécifiquement dans le soleus de souris, est similaire à certaines régions du cerveau. Nous avons par la suite analysé les effets du vieillissement dans les régions du cerveau précitées et notre étude a permis de déceler une augmentation significative du contenu en calcium total avec l'âge dans le cortex cérébral et le striatum tandis qu'une diminution significative du contenu en zinc total avec l'âge a été détectée dans l'hippocampe.

Mots clés : calcium, zinc, BAPTA, TPEN, cerveau, vieillissement, muscle squelettique.

SUMMARY

Determination of total calcium and zinc contents in various brain regions and in skeletal muscle

By

Fatou Touré

Physiology Program

Thesis presented at the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of Master degree diploma Maitrise ès sciences (M.Sc.) in Physiology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Lamboleay *et al.*, 2015 (*Journal of General Physiology* 145(2):127-153) developed a new method for measuring total calcium concentrations in whole skeletal muscle ($[Ca_T]$). The technique is based on the properties of BAPTA whose UV absorbance spectrum is modified according to the amount of Ca^{2+} bound to it (Tsien, 1980; *Biochemistry*, 19(11): 2396-2404) and Qian and Colvin, 2015 (*Journal of General Physiology* 147(1): 95-102) pointed out that the binding of BAPTA to Ca^{2+} was not selective and that other divalent, including Zn^{2+} , were also captured during the analysis; thus adding a proportion of zinc to the determined calcium value. We describe the development of a method based on that of Lamboleay *et al.*, 2015 now allowing for the elimination of the competition that previously existed between calcium and zinc regarding BAPTA's binding sites primarily through the introduction of TPEN, a chelator presenting a high affinity for Zn^{2+} compared to Ca^{2+} . We then investigated the application of the newly developed method to specific brain regions involved in several neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's or Huntington's disease in order to determine the associated $[Ca_T]$ and $[Zn_T]$ values in physiological conditions, along with the study of skeletal muscles. In mice, the $[Ca_T]$ values (mmoles/kg, (N, SEM)) were determined for the olfactory bulbs: 2.03 (24, 0.2), cerebellum: 0.9 (12, 0.05), hippocampus: 1.18 (24, 0.07), striatum: 1.23 (24, 0.14), cerebral cortex: 0.9 (12, 0.02), EDL: 3.28 (12, 0.14) and soleus: 3.42 (12, 0.25). The $[Zn_T]$ values (mmoles/kg, (N, SEM)) corresponding to the same biological tissues were measured for the olfactory bulbs: 0.59 (24, 0.13), cerebellum: 0.26 (12, 0.09), hippocampus: 0.62 (24, 0.06), striatum: 0.51 (24, 0.04), cerebral cortex: 0.3 (12, 0.04), EDL: 0.25 (12, 0.06) and soleus: 0.56 (12, 0.1). In summary, the total calcium content determined in the skeletal muscles studied is significantly greater than that of the brain regions on one hand and on the other hand the total zinc content, specifically in mouse soleus, is similar to that of certain regions of the brain. We then analyzed the effects of aging in the aforementioned brain regions and our study reveals a significant increase in total calcium content with age in the cerebral cortex and the striatum while a significant decrease in total zinc content with age was detected in the hippocampus.

Keywords: calcium, zinc, BAPTA, TPEN, brain, aging, skeletal muscle.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	iii
Summary	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements	xii
Introduction	1
Couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique.....	2
Techniques de mesure de concentrations en calcium.....	2
Concentration en calcium libre ($[Ca^{2+}]_i$)	2
Concentration totale en calcium ($[Ca_T]$)	3
Méthode BAPTA.....	5
Description	5
Spécificités structurelles des muscles étudiés par Lamboley et al., 2015	6
Valeurs mesurées par Lamboley et al., 2015	7
Estimation de la $[Ca_T]$ dans différents compartiments musculaires	8
Limites	9
Implications physiologiques du zinc dans le muscle.....	10
Application au cerveau	12
Implications physiologiques du calcium et du zinc dans le cerveau	12
Implications physiologiques du calcium.....	12
Implications physiologiques du zinc	14
Choix des tissus biologiques à analyser (cerveau).....	18
Maladies d'Alzheimer et de Huntington.....	19
Régions du cerveau analysées	21
Hypothèses de la recherche	25
Objectifs	26

Matériel et méthodes	27
Préparation des échantillons	27
Mesures d'absorbances du BAPTA	28
Analyse des données d'absorbances.....	31
Résultats	34
Développement de la nouvelle méthode.....	34
Résolution de problèmes	34
Calibration #1	35
Calcul expérimental de $[B_T]$	38
Validation des adaptations au protocole et calcul des coefficients d'extinction.....	42
Introduction du TPEN	46
Spectre d'absorbance du TPEN.....	46
Concentration de TPEN optimale.....	48
Modification du protocole et calibration #5	50
Adaptation du protocole et calibration #6.....	52
Calibration spécifique des échantillons de tissus biologiques	58
Application aux tissus biologiques	60
Modèle animal et tissus biologiques étudiés.....	60
Description du protocole	61
Préparation des échantillons	61
Mesures d'absorbances	64
Analyse des données d'absorbance.....	65
Différences entre le protocole développé et Lamboley et al., 2015	65
$[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ mesurées dans chaque groupe.....	66
Groupe I.....	66
Groupe II	68
Groupe III.....	69
Comparaison des valeurs de $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ mesurées.....	70
Tests statistiques et comparaisons.....	70
Distribution normale et homogénéité des variances	70
Comparaison des groupes d'échantillons.....	71
Régions du cerveau (Groupe I) vs muscles squelettiques (Groupe III)	71
Variations de $[Ca_T]$ et de $[Zn_T]$ en fonction de l'âge (Groupe I vs Groupe II).....	73
Proportions en zinc mesurées avec la nouvelle méthode.....	75

Discussion	77
Comparaison des valeurs mesurées aux études antérieures	77
Données du cerveau.....	77
Données des muscles squelettiques.....	78
Mesure du calcium.....	78
Mesure du zinc.....	79
Comparaison cerveau vs muscles squelettiques	80
Implications du vieillissement dans le cerveau.....	81
Augmentation du calcium avec l'âge.....	81
Diminution du zinc avec l'âge	83
Limites liées à la méthode développée	84
La nouvelle méthode BAPTA reste macroscopique.....	84
Le TPEN a une grande affinité pour d'autres divalents	85
Conclusions et perspectives.....	87
Conclusions.....	87
Perspectives	88
Distinction des compartiments intracellulaire, extracellulaire et spécificité cellulaire.....	88
Comparaison entre genres et espèces.....	88
Perspectives du projet	89
Proposition de projet de vieillissement pour l'application de la méthode BAPTA.....	89
 Liste des références.....	 91

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Spectres d'absorbance du BAPTA durant l'analyse d'échantillons avec (A et B) et sans muscle présent (C et D).....	30
Figure 2 : Calibration #1, $[Ca_T]$ mesurées (mM) en fonction des $[Ca_T]$ connues.....	36
Figure 3 : Calibration #2, Moyennes de $[B_T]$ mesurées (mM) en fonction de la condition de mélange.....	39
Figure 4 : Résolution du problème de mélange inadéquat.....	41
Figure 5 : Calibration #3, $[Ca_T]$ mesurées (mM).....	43
Figure 6 : Calibration #4, $[Zn_T]$ mesurées (mM).....	44
Figure 7 : Spectre d'absorbance de 0,2 mM de TPEN	47
Figure 8 : $[Zn_T]$ mesurées avec 50 μ M de TPEN	49
Figure 9 : Protocole de mesure après introduction du TPEN	50
Figure 10 : Calibration #5, mesures simultanées de $[Ca_T]$ et de $[Zn_T]$	51
Figure 11 : Adaptation du protocole avec 3 puits par échantillon	53
Figure 12 : Calibrations #6A et #6B, analyse d'échantillons lorsque le calcium est présent seul et simultanément avec du zinc.....	55
Figure 13 : Calibrations #6C et #6D, analyses d'échantillons lorsque le zinc est présent seul et simultanément avec du calcium	57
Figure 14 : Calibration spécifique au zinc pour chaque plaque analysée.....	59
Figure 15 : Protocole de préparation des échantillons.....	63
Figure 16 : Groupe I - Moyennes des $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ mesurées	67
Figure 17 : Groupe II – Moyennes des $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ mesurées.....	69
Figure 18 : $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ mesurées dans les régions du cerveau vs dans les muscles squelettiques.....	72
Figure 19 : Variations de $[Ca_T]$ mesurées en fonction de l'âge.....	73
Figure 20 : Variations de $[Zn_T]$ mesurées en fonction de l'âge.....	74
Figure 21 : Distribution tissulaire du zinc en termes de proportions.....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Valeurs moyennes de $[Ca_T]$ (S.D.; S.E.M.) dans les muscles étudiés	8
Tableau 2: Chélateurs de Ca^{2+} et de Zn^{2+} et leurs constantes d'affinité (M)	9
Tableau 3 : Valeurs des coefficients d'extinction calculés ($M^{-1}.cm^{-1}$)	45
Tableau 4 : Calibration #6 - Composition des solutions.....	54
Tableau 5 : Poids des tissus analysés (g) (S.D., S.E.M.)	61
Tableau 6 : Comparaison du protocole développé avec celui de Lamboley <i>et al.</i> , 2015	65
Tableau 7 : Groupe I - Moyennes des valeurs de $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ (S.D.; S.E.M.)	66
Tableau 8 : Groupe II - Moyennes des valeurs de $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ (S.D.; S.E.M.).....	68
Tableau 9 : Groupe III - Moyennes des valeurs de $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ (S.D.; S.E.M.)	69
Tableau 10 : Résumé des moyennes de $[Ca_T]$ et de $[Zn_T]$ par groupe (S.D.; S.E.M.).....	77
Tableau 11: Chélateurs et leurs constantes d'affinité (M)	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAS	Spectroscopie d'absorbance atomique (Atomic absorbance spectroscopy)
A β	β -amyloïde
AD	Maladie d'Alzheimer (Alzheimer's Disease)
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
[B _T]	Concentration totale en BAPTA
Ca	Calcium
Ca ²⁺	Ion calcium
[Ca ²⁺] _i	Concentration en calcium libre dans le cytosol
[Ca _T]	Concentration totale en calcium dans le tissu biologique entier
CaCl ₂	Chlorure de calcium
Couplage E-C	Couplage excitation-contraction
CSQ	Calséquestrine
CDF	Facilitateur de diffusion de cations
CICR	Mécanisme de libération du calcium par le calcium
DHP-R	Récepteurs à la dihydropyridine
DMT	Transporteur de métal divalent
EDL	Extensor Digitorum Longus
EGTA	Etylene Glycol-bis (2-aminoethylether)- N ,N ,N ' ,N ' -tetraacetic acid
ER	Réticulum endoplasmique
GABA _A	γ -aminobutyric acid type A
HD	Maladie de Huntington (Huntington's Disease)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HT-29	Cellules d'adénocarcinome du colon humain
ICP-AES	Spectrométrie d'émission optique couplée à un plasma inductif
ICP-MS	Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif
KCl	Chlorure de potassium
K _d	Coefficient de dissociation

Mg ²⁺	Ion magnésium
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MS	Solution de mesure de la méthode BAPTA (Measurement Solution)
MT	Métallothionéines
[MT] _i	Concentration intracellulaire en métallothionéines
Na	Sodium
Na ⁺	Ion sodium
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PA	Potentiel d'action (Action Potential)
rpm	Révolution par minute
RyR	Récepteurs à la ryanodine
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
S.E.M.	Erreur standard de la moyenne (Standard Error of the Mean)
S.D.	Déviatiion standard (Standard Deviation)
SR	Réticulum sarcoplasmique
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylméthyl)éthylènediamine
[TPEN]	Concentration en TPEN
ZIP	Zrt-Irt Like Protein
Zn	Zinc
Zn ²⁺	Ion zinc
[Zn ²⁺] _i	Concentration en zinc libre dans le milieu intracellulaire
[Zn ²⁺] _e	Concentration en zinc libre dans le milieu extracellulaire
[Zn _T]	Concentration totale en zinc dans le tissu biologique entier
ZnT	Transporteur de zinc

REMERCIEMENTS

Merci à mon directeur de recherche, le professeur Paul C. Pape, pour son soutien inconditionnel et la confiance qu'il m'a accordée.

Merci au Dr Rona Graham et à Mélissa Laroche pour avoir significativement contribué à l'extraction des régions du cerveau analysées dans la présente étude.

Merci à Sandra Lopez Romero pour avoir participé à l'analyse des muscles squelettiques étudiés.

Merci aux Dr Eric Rousseau et Ahmed Chraïbi pour leurs conseils et encadrement.

Je remercie mes parents, mes frères et ma fille pour m'avoir encouragée et soutenue. Merci également à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce projet de recherche.

INTRODUCTION

Ayant pendant longtemps suscité un intérêt particulier dans le domaine de la recherche, le calcium représente un élément essentiel en physiologie notamment avec l'existence de divers mécanismes impliqués dans le maintien de son homéostasie. En effet, un manque de régulation adéquat du contenu en calcium a été relié à l'occurrence de plusieurs pathologies (Szydlowska et Tymianski, 2010).

Entre autres phénomènes physiologiques dans lesquels le calcium joue un rôle primordial, il est possible de citer la formation des os et des dents, le maintien du rythme cardiaque, la coagulation du sang ou encore la transmission synaptique. Toutefois, notre laboratoire s'est particulièrement intéressé au calcium en raison de son implication dans la contraction musculaire, plus précisément dans le phénomène intitulé couplage excitation-contraction (couplage EC). Aussi, la libération de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique (SR) représente le phénomène déclencheur de la contraction musculaire.

La mise en contexte de notre étude se fera d'abord par un rappel concernant le couplage EC dans le muscle squelettique suivi d'explications concernant la méthode BAPTA initialement mise en place afin de pouvoir mesurer la concentration totale en calcium dans le tissu biologique entier ($[\text{Ca}_T]$). Ensuite, il sera fait mention de l'application au cerveau de la méthode développée pour intégrer la mesure de la concentration totale en zinc dans le tissu biologique entier ($[\text{Zn}_T]$) avant de terminer par les hypothèses et objectifs du projet de recherche.

Couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique

Le couplage EC représente l'ensemble des étapes aboutissant à la contraction musculaire, de la détection du signal électrique à la création de la réponse mécanique. D'abord, le potentiel d'action (PA) généré au niveau de la plaque motrice se propage le long des tubules T transverses, représentant des invaginations du sarcolemme et comportant des canaux calciques sensibles au voltage appelés récepteurs à la dihydropyridine (DHP-R). Suite à la dépolarisation, les DHP-R subissent un changement de conformation leur permettant de venir se coupler mécaniquement à d'autres types de canaux de libération du Ca^{2+} localisés au niveau du SR: les récepteurs à la ryanodine (RyR). Ultimement, le Ca^{2+} provenant du SR est massivement libéré dans le myoplasme et peut à présent se lier à la troponine C, sous unité de la troponine étant associée, avec la tropomyosine, à l'actine au niveau des myofilaments fins. Il en résulte alors un changement de conformation de la troponine entraînant un dégagement de la tropomyosine et permettant de démasquer les sites de liaison de la myosine au niveau du myofilament d'actine. La myosine peut finalement se lier à l'actine, provoquant ainsi le mécanisme de contraction musculaire. (Boron & Boulpaep, 2012, Chapter 9: Cellular physiology of cardiac, skeletal and smooth muscle, pages 454-457). Sachant que l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le myoplasme représente le signal initiateur majeur de la contraction musculaire, la mesure de cette valeur est donc primordiale afin de pouvoir mieux comprendre ce mécanisme.

Techniques de mesure de concentrations en calcium

Concentration en calcium libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

L'ion calcium (Ca^{2+}) joue un rôle majeur de second messenger dans le cadre de réactions de réponses cellulaires suite à divers stimuli (Gareri et *al.*, 1995). En effet, dans le cytoplasme de la cellule au repos, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est maintenue à des valeurs faibles (de l'ordre de 10^{-7} M) (Endo, 2006). Le Ca^{2+} est ensuite libéré en réponse à un stimulus, permettant d'augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et de générer la (ou les) réaction(s) cellulaire(s) associée(s) (Endo, 2006). Ainsi, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ varie en fonction de l'état physiologique de la cellule; l'évaluation du rôle critique du calcium en tant que messenger intracellulaire nécessitant donc la mesure des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (concentrations en Ca^{2+} libre dans le cytosol) en conditions contrôles de même que l'étude de ces valeurs en fonction de stimuli et de réponses cellulaires variés (Gryniewicz et *al.*,

1985). Aussi, l'augmentation relative de Ca^{2+} en fonction du temps initie l'activation des myofilaments (dans le cadre de la contraction musculaire), la force générée étant graduelle et dépendant de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Beers, 2002).

Plusieurs méthodes permettent de mesurer la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cellules de mammifères (Borle, 1990), incluant l'utilisation d'indicateurs fluorescents tels que le Quin-2 (Tsien et *al.*, 1982) ou encore le Fura-2 et l'Indo-2 (Grynkiewicz et *al.*, 1985). Ces indicateurs présentent plusieurs avantages dont la facilité d'utilisation et d'incorporation dans les cellules vivantes sous forme d'esters acétoxyméthyliques (Borle, 1990). Cependant, ces méthodes présentent des inconvénients majeurs tels que le temps de réponse relativement lent, l'action tampon du calcium, les fuites possibles d'indicateurs au niveau de certaines cellules de même que l'incorporation occasionnelle de ces senseurs à des organelles intracellulaires (Borle, 1990). Par ailleurs, l'utilisation d'indicateurs fluorescents relève de méthodes optiques mesurant des données essentiellement qualitatives de concentrations en Ca^{2+} , or l'acquisition de valeurs quantitatives concernant la teneur en Ca^{2+} des cellules et tissus biologiques reste primordiale (Alvarez-Leefmans et *al.*, 1981).

Concentration totale en calcium ($[\text{Ca}_T]$)

La concentration totale en calcium correspond à la totalité du calcium présent au niveau d'un tissu biologique et donc la somme du Ca^{2+} libre et du Ca^{2+} lié à des protéines, autant dans les compartiments intracellulaires qu'extracellulaires. Dans le cas du muscle squelettique, l'essentiel du calcium provient du compartiment intracellulaire, plus précisément du SR, qui « joue un rôle central dans l'homéostasie calcique et contrôle le stock de calcium intracellulaire (stockage, libération et recapture du calcium) nécessaire à la contraction puis à la relaxation de la fibre musculaire » (Rigoard et *al.*, 2009). Tel qu'indiqué par Lamboley et *al.*, 2015 dans leurs équations 23c et 23d, 77 % et 87 % du contenu total en calcium de l'EDL et du soleus, respectivement, résident dans le SR au repos. La calséquestrine (CSQ) représente la protéine de liaison majeure du Ca^{2+} dans le SR (Fénelon et *al.*, 2012; MacLennan et Wong, 1971), permettant ainsi la libération massive de Ca^{2+} dans le cytoplasme, par le SR, suite à une stimulation électrique. En effet, une concentration importante de CSQ a été déterminée au niveau des citernes terminales du SR (de l'ordre de 100 mg/ml; MacLennan et Wong, 1971). De plus, la CSQ « présente une forte capacité à lier le calcium (40-50 molécules de calcium/molécule de CSQ) mais avec

une faible affinité » pour le Ca^{2+} (Rigoard et *al.*, 2009; Cozens et Reithmeier, 1984). Il est important de noter que la valeur de $[\text{Ca}_T]$ est pertinente à la génération de la tension de réponse du muscle, considérant que l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]$ du cytosol en réponse à la stimulation est proportionnelle au taux de libération de $[\text{Ca}^{2+}]$ par le SR qui est, à son tour, approximativement proportionnel à la teneur totale en calcium du SR (se référer aux équations B21 et à la Figure 10C de Pape et *al.*, 1995).

Par ailleurs, la valeur de la $[\text{Ca}_T]$ mesurée équivaut à la concentration totale en calcium du tissu biologique entier, permettant ainsi d'acquérir une connaissance plus précise de la capacité totale de séquestration du calcium par le muscle ou tissu biologique d'intérêt; à distinguer de la concentration totale en calcium pouvant être déterminée au niveau de fibres musculaires isolées (Pape et *al.*, 2007). De plus, déterminer la $[\text{Ca}_T]$ permet d'éviter différentes limites technologiques liées à l'étude de fibres musculaires (Pape et *al.*, 2007) ou de cellules isolées avec l'utilisation d'indicateurs fluorescents (Tsien et *al.*, 1982) de même que le manque de contrôle que l'expérimentateur pourrait avoir sur sa préparation, concernant notamment la gestion des flux de Ca^{2+} et la contamination en Ca^{2+} possible par le matériel de laboratoire ou les solutions utilisées lors des mesures (Borle, 1990).

Auparavant, la spectrométrie d'absorbance atomique (AAS) représentait la méthode la plus couramment utilisée pour déterminer le contenu total en calcium dans un muscle squelettique entier. L'utilisation de cette technologie requière un mode de traitement préalable de l'échantillon de muscle; le plus commun et le plus récent étant représenté par l'homogénéisation du tissu biologique, son exposition à de l'acide trichloroacétique pour dénaturer les protéines enfin suivie d'une centrifugation afin d'éliminer certains composants musculaires (Gissel et Clausen, 1999; Everts et *al.*, 1993; Yoshida et *al.*, 2006; Glesby et *al.*, 1988).

Malgré la contribution majeure de l'AAS à l'avancement des connaissances scientifiques en termes de mesures de $[\text{Ca}_T]$, cette méthode présente certains inconvénients dont la complexité d'utilisation de même que le degré de reproductibilité des résultats (Manno et Rios, 2015). En effet, la mesure effectuée par AAS est produite en même temps que l'échantillon est consommé, représentant ainsi une mesure différentielle. De plus, la valeur déterminée reflète une concentration en calcium, à distinguer de la teneur totale en calcium de l'échantillon (Manno et Rios, 2015).

Prenant en compte les limites technologiques préexistantes, notre laboratoire a développé une méthode de mesure de la $[Ca_T]$ (aussi appelée méthode BAPTA) appliquée à l'analyse de muscles squelettiques (Lamboleay *et al.*, 2015) afin de pouvoir notamment représenter une alternative à l'AAS. La méthode BAPTA est une méthode de mesure quantitative permettant de déterminer avec précision le contenu total en calcium du muscle squelettique entier (mesure intégrative), tout en étant plus simple (un grand nombre d'échantillons peut être analysé en un temps réduit), reproductible (les valeurs de S.E.M. varient entre 0,09 et 0,17 mmoles/ kg de poids humide pour l'ensemble des résultats publiés par Lamboleay *et al.*, 2015; incluant des mesures chez le rat, la souris et la grenouille) et pratique (la digestion préalable de l'échantillon dans de l'acide n'est pas nécessaire) comparativement à l'AAS (Manno et Rios, 2015).

Enfin, la méthode BAPTA reste versatile, permettant ainsi la comparaison des valeurs de $[Ca_T]$ mesurées dans les muscles squelettiques avec d'autres tissus biologiques entiers afin de pouvoir éventuellement déceler des disparités physiologiques et/ou pathophysiologiques liées au contenu total en calcium.

Méthode BAPTA

Description

Lamboleay *et al.*, 2015 ont décrit une méthode basée sur les propriétés du BAPTA, chélateur de Ca^{2+} , dont le spectre d'absorbance ultraviolet (UV) change en fonction de la concentration en Ca^{2+} liée (Tsien, 1980). Associé à l'utilisation du BAPTA, Lamboleay *et al.*, 2015 ont fait usage d'EGTA ($K_{d Ca} = 0,38 \times 10^{-9}$ M; Li, 2012), un autre chélateur ayant une affinité pour le Ca^{2+} plus élevée comparativement au BAPTA ($K_{d Ca} = 1,6 \times 10^{-7}$ M; Li, 2012), permettant ainsi de capturer la totalité du Ca^{2+} initialement liée au BAPTA. Ce phénomène aura pour conséquence de provoquer une augmentation de l'absorbance mesurée au niveau de l'échantillon, considérant que le BAPTA libre absorbe plus que le BAPTA lié. Le paramètre nommé K_d représente le coefficient de dissociation entre le chélateur étudié et l'ion d'intérêt. Il permet de jauger le degré d'affinité de la liaison chélateur-ion d'intérêt sachant que, techniquement, le K_d représente la concentration à

laquelle 50 % des sites de liaison du chélateur sont occupés par l'ion d'intérêt. Par conséquent, plus la valeur du K_d est faible, plus l'affinité entre les deux entités est élevée. Ensuite, l'utilisation de la loi de Beer-Lambert permet de précisément déterminer la $[Ca_T]$ initialement présente dans le muscle (la précision de la technique est de l'ordre du micromolaire). En effet, la loi de Beer-Lambert décrit la proportionnalité existant entre la concentration d'un élément chimique en solution et la mesure d'absorbance qui y est associée, s'écrivant $A = \varepsilon \cdot l \cdot c$; A étant l'absorbance de la solution mesurée, ε le coefficient d'absorption molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), l la longueur du chemin traversé par la lumière (cm) et c la concentration de l'espèce chimique d'intérêt (Mantele et Deniz, 2017). Lamboley *et al.*, 2015 ont étudié le contenu total en calcium au niveau de muscles squelettiques à contraction rapide (EDL, extensor digitorius longus) et à contraction lente (soleus) chez la souris (C57BL/6) et le rat (Sprague Dawley). De plus, les muscles squelettiques dénommés ileofibularis et semitendinosus de grenouille (*Rana pipiens*) ont également été analysés.

Spécificités structurelles des muscles étudiés par Lamboley et al., 2015

EDL et soleus

Les types de fibres composant l'EDL et le soleus peuvent être divisés en deux principales catégories: les fibres de type I et les fibres de type II. Les fibres de type I sont résistantes à la fatigue, développent une vitesse de contraction lente de même qu'une faible force tandis que les fibres de type II manifestent plutôt une vitesse de contraction rapide, se fatiguent vite et génèrent une grande force (Marieb & Hoen, 2015, Chapitre 9 : Les muscles et le tissu musculaire, page 358).

En termes de composition, l'EDL de souris (C57BL/6) est majoritairement constitué de fibres de type II (dans l'ordre de 96 %; Augusto *et al.*, 2004) tandis que le soleus de souris (C57BL/6) comprend 63 % de fibres de type II (Augusto *et al.*, 2004; Tyagi *et al.*, 2017) et 37 % de fibres de type I (Augusto *et al.*, 2004; Tyagi *et al.*, 2017). Paradoxalement, le soleus de rat (Sprague Dawley) contient 84 % de fibres de type I et seulement 16 % de fibres de type II (Soukup *et al.*, 2002, données basées sur les travaux d'Ariano *et al.*, 1973; Ho *et al.*, 1983; Armstrong et Phelps, 1984; Gillespie *et al.*, 1987; Pousson *et al.*, 1991;

Almeida-Silveira et *al.*, 1994; Chopard et *al.*, 2001). L'EDL de rat (Sprague Dawley) a une composition similaire à celle de l'EDL de souris (C57BL/6) avec 96 % de fibres de type II (Soukup et *al.*, 2002, données basées sur les travaux d'Ariano et *al.*, 1973; Armstrong et Phelps, 1984; Egginton, 1990; Vesely et *al.*, 1999; Chopard et *al.*, 2001).

En résumé, les EDL de souris et de rat restent structurellement similaires tandis que le soleus de souris se distingue de celui du rat en étant majoritairement composé de fibres de type II (63 %) (Soukup et *al.*, 2002; Augusto et *al.*, 2004).

Iliofibrularis et semitendinosus (grenouille)

Chez la grenouille (*Rana pipiens*), l'iliofibrularis et le semitendinosus appartiennent à une famille de muscles squelettiques dont la participation au mouvement de saut, en raison de leur morphologie, a été jugée peu probable (Lutz et *al.*, 1998); contrairement à d'autres types de muscles squelettiques extenseurs plus volumineux tels que le plantaris ou le gracilis, capables de générer une force importante et donc probablement impliqués dans le saut (Lutz et *al.*, 1998).

La nomenclature des types de fibres composant les muscles squelettiques des amphibiens est quelque peu différente de celle des mammifères. En effet, les fibres de type 1 représentent les fibres les plus rapides et les plus puissantes tandis que les fibres de type 3 constituent les fibres les plus lentes et développent une force moindre (Lutz et *al.*, 1998). Le semitendinosus est composé de 63 % de fibres de type 2 (type de fibres intermédiaires) et 14 % de fibres de type 1 tandis que l'iliofibrularis comprend 52 % de fibres de type 2 et 20 % de fibres de type 1 (Lutz et *al.*, 1998, Peachey et Huxley, 1962).

Valeurs mesurées par Lamboley et al., 2015

Le Tableau 1 indique les différentes valeurs de $[Ca_T]$ obtenues pour l'EDL et le soleus de souris (C57BL/6) et de rat (Sprague Dawley) de même que pour l'iliofibrularis et le semitendinosus de grenouille (*Rana pipiens*) (Lamboley et *al.*, 2015).

**Tableau 1 : Valeurs moyennes de $[Ca_T]$ (S.D.; S.E.M.) dans les muscles étudiés
par Lamboley *et al.*, 2015**

Espèce	Type de Muscle	$[Ca_T]$ mmoles/kg tissu humide	$[Ca_T]$ myoplasme mmoles/L de volume myoplasmique	N
Souris	EDL	2,71 (0,66; 0,09)	4,23 (1,03; 0,14)	54
Souris	Soleus	2,62 (0,81; 0,11)	4,08 (1,25; 0,17)	54
Rat	EDL	1,46 (0,25; 0,09)	2,08 (0,37; 0,13)	8
Rat	Soleus	1,26 (0,28; 0,10)	1,74 (0,40; 0,14)	8
Grenouille	Ileofibularis & semitendinosus	1,88 (0,35; 0,11)	2,85 (0,54; 0,17)	10

En plus de l'approche assez innovatrice et directe de la technique décrite dans Lamboley *et al.*, 2015, les résultats obtenus par leurs auteurs sont en accord avec ceux de la littérature et ce pour chacun des trois types d'espèces animales étudiées dans l'article; permettant ainsi d'établir la validité de la méthode mise en place (Lamboley *et al.*, 2015).

Estimation de la $[Ca_T]$ dans différents compartiments musculaires

Associé à la mesure directe de la $[Ca_T]$, Lamboley *et al.*, 2015 sont parvenus à mettre en place des équations permettant de calculer de manière précise les proportions en calcium total correspondant à différents compartiments du muscle squelettique considéré: le compartiment intracellulaire hors SR, le compartiment intracellulaire dans le SR et le compartiment extracellulaire. Précisément, les équations 23c et 23d de Lamboley *et al.*, 2015 renseignent sur les contenus en calcium total des différents compartiments musculaires de l'EDL et du soleus, respectivement.

Limites

Qian et Colvin, 2015 ont effectué une critique majeure de la méthode BAPTA publiée, en démontrant notamment dans leurs travaux que le BAPTA et l'EGTA ne liaient pas uniquement le Ca^{2+} , mais capturaient également Zn^{2+} avec une affinité plus importante (BAPTA : $K_{d\text{Zn}} = 8 \times 10^{-9}$ M; Li, 2012; EGTA : $K_{d\text{Zn}} = 7,8 \times 10^{-12}$ M; Li, 2012).

Le Tableau 2 apporte des renseignements concernant différents chélateurs communément utilisés pour mesurer du calcium (à l'exception du TPEN dont il sera fait mention de manière plus détaillée dans la section Méthodes) et qui en fait lient également le Zn^{2+} (Li, 2012; Opazo *et al.*, 2006; Colvin *et al.*, 2008; Arslan *et al.*, 1985).

Tableau 2: Chélateurs de Ca^{2+} et de Zn^{2+} et leurs constantes d'affinité (M)

Chélateurs	$K_{d\text{Zn}}$ (M)	$K_{d\text{Ca}}$ (M)
BAPTA	$8,0 \times 10^{-9}$	$1,6 \times 10^{-7}$
EGTA	$7,8 \times 10^{-12}$	$0,4 \times 10^{-9}$
APTRA	$1,9 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-5}$
EDTA	$3,2 \times 10^{-17}$	$2,0 \times 10^{-11}$
TPEN	$2,6 \times 10^{-16}$	$1,3 \times 10^{-4}$

De plus, ces informations permettent de mettre en évidence que les valeurs supposées de calcium total déterminées à l'aide des chélateurs indiqués dans le tableau représentent en fait une somme de $[\text{Ca}_T]$ et de $[\text{Zn}_T]$ (dans des proportions indéterminées) et non uniquement du calcium total, ajoutant ainsi un pourcentage d'erreur aux valeurs publiées.

Advenant que du zinc soit présent dans les tissus biologiques étudiés à des concentrations négligeables, l'erreur liée à l'utilisation des chélateurs précédemment cités pourrait également être minimale. Cependant, Qian et Colvin, 2015 (dans leur Figure 1) ont pu mesurer, en utilisant une méthode de spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS), des $[\text{Zn}_T]$ non seulement détectables mais en proportions assez importantes pour pouvoir influencer sur les valeurs de $[\text{Ca}_T]$ déterminées. En effet, Qian et Colvin, 2015 ont étudié des muscles squelettiques de rat et ont trouvé des $[\text{Zn}_T]$ de 0,528 et 0,192 mmoles/kg pour le soleus et le plantaris, respectivement. Aussi, la proportion de calcium total apparent identifiée comme du zinc serait de 23,5% pour le soleus et 8,9 % pour le plantaris de rat;

élément venant directement contredire l'assumption 2 de Lamboley *et al.*, 2015 considérant que la liaison du BAPTA avec d'autres ions était négligeable.

Par conséquent, une mesure précise et fiable de la $[Ca_T]$ nécessitera obligatoirement le développement d'une méthode permettant de déterminer de manière distincte les proportions dans lesquelles les deux divalents (Ca^{2+} et Zn^{2+}) sont présents dans les échantillons. Dans la présente étude, nous nous intéresserons spécifiquement à l'analyse de muscles squelettiques de souris (EDL et soleus) pour lesquels nous comparerons les résultats obtenus à ceux de Qian et Colvin, 2015. Un des objectifs de la présente étude sera de déterminer si les résultats obtenus par Qian et Colvin, 2015 chez le rat seront également reproductibles chez la souris (hypothèse 1).

Implications physiologiques du zinc dans le muscle

Autant la présence de zinc a été démontrée à travers la mesure de $[Zn_T]$ non négligeable dans des muscles squelettiques (Qian et Colvin, 2015), autant l'étude des implications physiologiques de ce divalent, spécifiquement dans la contraction musculaire, requière des investigations plus approfondies. En effet, peu de données renseignant de manière précise sur la localisation et les voies de signalisation impliquant potentiellement le Zn^{2+} existent dans la littérature.

Dans un article précurseur dans ce domaine, Isaacson et Sandow, 1963 ont pu observer que l'amplitude de la tension de réponse mesurée au niveau d'un muscle squelettique de grenouille (Sartorius) à la suite d'une stimulation unique (twitch) était jusqu'à 3 fois plus élevée après avoir préalablement exposé le muscle à une solution contenant 0,1 mM de zinc; comparativement au même muscle non exposé au zinc extracellulaire (Figure 1 de leur article). De plus, les changements dans l'amplitude de la tension mesurée en réponse à la stimulation électrique commençaient à se manifester à partir de 5 μM de zinc extracellulaire (seuil) et les effets maximum apparaissaient dès 50 μM de zinc. Les auteurs concluent succinctement que le zinc aurait la capacité d'agir à 2 niveaux: membranaire ou intracellulaire. Les résultats obtenus suggèrent fortement que le Zn^{2+} extracellulaire, en agissant directement sur la modulation de la contraction musculaire, activerait des mécanismes encore peu connus. Ceux-ci pourraient faire intervenir un blocage de

l'échangeur sodium-calcium (Na-Ca) au niveau de la membrane plasmique, empêchant ainsi l'extrusion du calcium vers l'extérieur de la fibre musculaire; ayant ultimement pour effet l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le myoplasme et donc plus de Ca^{2+} serait disponible lors de la stimulation subséquente. Par ailleurs, Caputo *et al.*, 2016 ont confirmé l'effet potentiateur du Zn^{2+} en détectant une augmentation significative du courant transitoire calcique (dans sa phase de montée) suivie d'une prolongation de son temps de décroissance après exposition de fibres musculaires squelettiques de grenouille (tibialis anterior) à 1 mM de zinc. L'augmentation du courant calcique due à l'exposition au Zn^{2+} était plus modeste dans des fibres musculaires squelettiques de souris (Flexor Digitorum Brevis), amenant Caputo *et al.*, 2016 à conclure qu'en présence de Zn^{2+} , il y aurait un plus grand nombre de DHP-R recrutés et de RyR activés suite au PA; entraînant ainsi un relargage accru de Ca^{2+} dans le cytoplasme. Toujours selon Caputo *et al.*, 2016, la différence observée entre les fibres musculaires des deux espèces pourrait provenir de l'activation supplémentaire des RyR3 chez la grenouille par le mécanisme de libération du calcium par le calcium (Calcium induced calcium release) sachant que les RyR3 sont absents des Flexor Digitorum Brevis de mammifère.

Concernant à présent la localisation exacte du zinc, Palmer *et al.*, 2006 (dans leur Figure 1) ont utilisé une technique de fluorescence aux rayons X dans des cardiomyocytes et ont visualisé que des pools (réservoirs) de Zn^{2+} étaient spatialement distribués suivant une périodicité hautement régulière de 1,65 μm , suggérant fortement que les striations transverses obtenues pourraient être corrélées à des structures spécifiques le long des bandes I (bandes claires du sarcomère contenant uniquement des filaments d'actine); s'agissant très probablement du SR. Une hypothèse émise dans l'article serait que la CSQ aurait également la capacité de lier le Zn^{2+} selon un mécanisme similaire à la liaison au Ca^{2+} (se référer à la sous-section « Concentration totale en calcium » dans la catégorie « Techniques de mesure de concentrations en calcium »).

En outre, du Zn^{2+} a été mesuré dans des muscles squelettiques (il est également présent dans le muscle cardiaque; Tuncay *et al.*, 2011) dans des proportions non négligeables et il semblerait qu'il puisse être stocké dans le SR d'une manière physiologiquement comparable au stockage du Ca^{2+} . Une question légitime découlant de cette observation serait de déterminer si, d'un point de vue électrophysiologique, il y aurait des similitudes

entre les courants calcique et zinc selon différentes conditions. Tuncay *et al.*, 2011 se sont justement intéressés à ce sujet et ont comparé les cinétiques des courants calcique et zinc dans des cardiomyocytes au repos (sparks) et stimulés électriquement (transients) en utilisant des indicateurs fluorescents. Leurs résultats prouvent l'existence d'une similitude prononcée entre l'augmentation des signaux cytosoliques relatifs au calcium et au zinc, concernant autant les sparks que les transients, ce qui suggérerait qu'il y aurait une signalisation commune entre le Ca^{2+} et le Zn^{2+} , autant dans la cellule cardiaque au repos qu'en termes de réponse à une stimulation électrique. Ces évidences soulèvent la probabilité que du Zn^{2+} puisse être libéré du SR après stimulation électrique et puisse donc avoir des implications qu'il faudrait d'avantage analyser. Aussi, les mécanismes régissant la libération spontanée de Zn^{2+} dans une cellule cardiaque de même que leur importance en physiologie cellulaire doivent encore être investigués.

Application au cerveau

Découlant d'une collaboration avec le Dr Rona Graham, notre laboratoire a souhaité appliquer la méthode BAPTA développée (plus d'éléments seront donnés dans la section Méthodes) pour mesurer le contenu total en calcium et en zinc dans le cerveau. En effet, le Dr Graham est spécialisée dans la recherche portant sur les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer (AD) et de Huntington (HD) qui surviennent généralement lors du vieillissement (Lessard-Beaudoin *et al.*, 2015; Cerbai *et al.*, 2012; Dorszewka *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 1995).

Implications physiologiques du calcium et du zinc dans le cerveau

Implications physiologiques du calcium

Outre les propriétés reconnues du Ca^{2+} en termes de signalisation cellulaire (Gareri *et al.*, 1995) et de stockage (Fénelon *et al.*, 2012; MacLennan et Wong, 1971), il joue un rôle primordial dans un phénomène indispensable à la transmission synaptique et donc la propagation de messages nerveux d'un neurone à l'autre: l'exocytose. Les propriétés électriques du PA permettent l'ouverture de canaux calciques au niveau du bouton terminal du neurone présynaptique, occasionnant ainsi l'entrée massive de Ca^{2+} indispensable à la migration des vésicules de neurotransmetteurs vers la fente synaptique. Ultimement, ces

vésicules fusionnent avec la membrane plasmique; entraînant la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique et le déclenchement de mécanismes spécifiques (excitation ou inhibition) au niveau du neurone postsynaptique.

Aussi, le Ca^{2+} est impliqué dans des mécanismes d'apprentissage et de la mémoire notamment à travers le récepteur ionotrope au glutamate N-méthyl-D-aspartate (NMDA) qui conduit certains cations dont le Ca^{2+} (Peng *et al.*, 2011). Les récepteurs NMDA représentent des canaux ioniques ligand-dépendants dont l'activation nécessite plusieurs éléments: la liaison de deux agonistes (le glutamate et la glycine) associée à une dépolarisation membranaire permettant de supprimer l'effet de blocage normalement exercé par les ions Mg^{2+} (Furukawa *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2011). L'activation des récepteurs NMDA génère un afflux de cations incluant le Ca^{2+} (le canal NMDA permettrait également de moduler la perméabilité en certains ions monovalents tels que le Na^+ ou le K^+ , Furukawa *et al.*, 2005; MacDermott *et al.*, 1986), initiant ainsi des cascades de transduction de signaux qui à leur tour affecteraient la transmission synaptique (Furukawa *et al.*, 2005; MacDermott *et al.*, 1986) et aboutiraient notamment à la potentialisation à long terme (Peng *et al.*, 2011). En résumé, les canaux NMDA, normalement fermés, peuvent être ouverts par le PA arrivant à la synapse et la libération de glutamate; permettant ainsi l'entrée de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique. Il est à noter que l'entrée du Ca^{2+} dans le cytoplasme des neurones postsynaptiques peut également se faire via des canaux calciques voltage dépendants (Peng *et al.*, 2011). Deux implications majeures du Ca^{2+} intracellulaire découlent de ce phénomène: la capacité de modification des « protéines dans la terminaison post synaptique ainsi que dans la terminaison présynaptique au moyen de messagers rétrogrades », amplifiant ainsi la réponse aux stimuli subséquents; et l'activation de « gènes dans le noyau du neurone postsynaptique, ce qui déclenche la synthèse de protéines synaptiques » (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 12 : Le système nerveux central, page 536). Ces deux mécanismes, primordiaux au phénomène de potentialisation à long terme, permettent concrètement d'augmenter l'efficacité synaptique apparemment liée à la mémorisation (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 12 : Le système nerveux central, page 536).

Implications physiologiques du zinc

Le zinc semble être, après le fer, le second métal de transition le plus abondant dans le corps (Tuncay *et al.*, 2011). Dans les neurones, la concentration en Zn^{2+} libre dans le milieu intracellulaire ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) serait de l'ordre du nanomolaire, équivalente à celle du milieu extracellulaire ($[\text{Zn}^{2+}]_e$) (Colvin *et al.*, 2003). De même, une estimation a été donnée de la $[\text{Zn}_T]$ dans le cytosol des neurones, consistant en une valeur de 150 μM (Colvin *et al.*, 2003).

D'un point de vue biologique, le Zn^{2+} représente un cofacteur catalytique indispensable à la fonctionnalité de nombreuses enzymes (le divalent interagirait avec près de 10 % du protéome humain) et jouerait également un rôle de second messenger capable de transformer un stimulus extracellulaire en événements de signalisation intracellulaires (Pitt et Stewart, 2015; Fukada *et al.*, 2011; Yamasaki *et al.*, 2007). Par exemple, des évidences suggèrent que le Zn^{2+} aurait la capacité d'agir comme un neurotransmetteur (Colvin *et al.*, 2003). De même, des stimuli aboutissant à un phénomène d'exocytose induiraient la libération de Zn^{2+} et son absorption dans le cytoplasme des neurones (Yamasaki *et al.*, 2007). Le Zn^{2+} libéré par voie synaptique serait probablement transporté vers des cellules adjacentes (telles que les neurones postsynaptiques et les cellules gliales) et fonctionnerait comme un modulateur et un médiateur de la signalisation cellulaire (Yamasaki *et al.*, 2007). Précisément, le Zn^{2+} agirait d'une manière similaire à un neurotransmetteur: comme un facteur de signalisation autocrine ou paracrine, transcellulaire ou transmembranaire (Yamasaki *et al.*, 2007). De plus, suite à l'arrivée du PA, de nombreuses terminaisons nerveuses glutamatergiques libéreraient des concentrations millimolaires de Zn^{2+} (provenant de vésicules synaptiques) au niveau de la fente synaptique associée (comparativement aux $[\text{Zn}^{2+}]$ au repos qui seraient de l'ordre du picomolaire); suggérant que le Zn^{2+} aurait des implications dans la transmission synaptique (Sensi *et al.*, 2009). En effet, le Zn^{2+} libéré dans la synapse aurait la possibilité d'interagir avec différents canaux ioniques du neurone post synaptique, modulant ainsi la transmission et la plasticité synaptiques (Sensi *et al.*, 2009). A titre d'exemple, l'activité des récepteurs NMDA (excitateurs) et γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) (inhibiteurs) peut être influencée par le divalent (Smart *et al.*, 2004). En effet, les récepteurs NMDA seraient directement inhibés par le Zn^{2+} alors que la transmission inhibitrice médiée par certains récepteurs GABA_A

pourrait être potentialisée par un mécanisme présynaptique, entraînant ainsi une libération accrue de neurotransmetteur inhibiteur (Smart *et al.*, 2004).

D'autre part, le Zn^{2+} imiterait l'action de certaines hormones, de facteurs de croissance et de cytokines, suggérant un impact du divalent sur certaines molécules de signalisation intracellulaires (Beyersmann et Haase, 2001). Par exemple, l'inhibition des protéines de type tyrosine phosphatases par le Zn^{2+} a préalablement été démontrée (Brautigam *et al.*, 1981).

Au niveau moléculaire, le Zn^{2+} régulerait également l'expression génétique à travers l'activation de facteurs de transcription (Gower-Winter et Levenson, 2012). En effet, le Zn^{2+} serait responsable de la capacité de liaison de l'ADN à de nombreux facteurs de transcription grâce à la formation de molécules connues sous le nom de protéines à doigts de zinc (Gower-Winter et Levenson, 2012). Les protéines à doigts de zinc sont exprimées de manière omniprésente et régulent directement l'expression des gènes, interagissant notamment avec l'ARN et permettant de faciliter les interactions protéine-protéine (Gower-Winter et Levenson, 2012). Par ailleurs, le Zn^{2+} pourrait induire l'expression de certains gènes incluant ceux codant pour des molécules impliquées dans l'homéostasie du Zn^{2+} comme les transporteurs de Zn^{2+} ou encore les métallothionéines (MT) (Palmiter, 2004).

Dans le cerveau, plusieurs mécanismes impliqués dans l'homéostasie du Zn^{2+} ont été identifiés (plus d'éléments seront donnés dans la prochaine section), incluant des protéines de liaison du Zn^{2+} libre dans le cytosol des cellules nerveuses (Krezel *et al.*, 2006; Colvin *et al.*, 2008) et des transporteurs de Zn^{2+} permettant la séquestration du divalent dans des organelles intracellulaires ou son extrusion vers le milieu extracellulaire (Colvin *et al.*, 2003; Colvin *et al.*, 2008).

Protéines de liaison du Zn^{2+} dans le cytosol

Deux principales protéines de liaison du Zn^{2+} ont été suggérées dans la littérature: les métalloprotéines et le glutathion (Krezel *et al.*, 2006).

Les métallothionéines (MT) sont largement exprimées, très présentes dans le cerveau et auraient la possibilité de lier de manière réversible la majorité du Zn^{2+} présent dans le cytosol (Colvin *et al.*, 2003; Colvin *et al.*, 2008). Toutefois, au-delà du fait que la liaison du Zn^{2+} aux MT requière plus de recherche, certains éléments contradictoires existent

concernant cette hypothèse. En effet, la concentration en MT intracellulaire ($[MT]_i$) mesurée au niveau de cellules d'adénocarcinome du côlon humain (HT-29) serait égale à $0,54 \mu M$ (Krezel *et al.*, 2006; Colvin *et al.*, 2008). Sachant que chaque MT peut lier jusqu'à 7 ions métalliques divalents dont le Zn^{2+} (liaison non sélective) (Colvin *et al.*, 2008), la $[Zn^{2+}]$ capturable par les MT serait de $3,78 \mu M$ ($0,54 \mu M \times 7$), or, la $[Zn_T]$ déterminée dans le même type cellulaire serait de $264 \mu M$ (Krezel *et al.*, 2006). En d'autres termes, il resterait 98,5 % de Zn^{2+} non lié par les MT et dont la localisation n'est donc pas spécifiée (soit $260 \mu M$). Si les MT constituaient les protéines majeures de liaison du Zn^{2+} dans le cytosol, la $[MT]_i$ mesurée en conditions physiologiques aurait permis de réduire la $[Zn^{2+}]_i$ aux niveaux nanomolaires suggérés dans la littérature (Colvin *et al.*, 2003), ce qui n'est vraisemblablement pas le cas. De plus, il faudrait que la $[MT]_i$ soit presque 70 fois plus élevée dans le cerveau afin de pouvoir lier la même $[Zn^{2+}]_i$ déterminée dans les cellules HT-29, ce qui est plutôt improbable d'un point de vue physiologique. En résumé, malgré l'importance des MT relativement à la liaison au Zn^{2+} dans le myoplasme et à d'autres fonctions exercées dans la cellule (Colvin *et al.*, 2003; Colvin *et al.*, 2008); ces molécules ne semblent pas représenter un tampon majeur du divalent considérant le contenu total en Zn^{2+} intracellulaire.

Le glutathion est une molécule abondante et omniprésente en biologie (entre 1 et 20 mM mesurés dans certains compartiments intracellulaires) (Krezel *et al.*, 2003). Ligand biologique, il exerce des fonctions variées dans le métabolisme cellulaire et de défense, incluant la désintoxication en métaux lourds (Krezel *et al.*, 2003). Le glutathion a donc naturellement été suggéré comme étant un transporteur probable pour le Zn^{2+} (Krezel *et al.*, 2006; Colvin *et al.*, 2008).

Transporteurs de Zn^{2+}

Concernant les neurones, trois grandes familles de transporteurs de Zn^{2+} ont été proposées dans la littérature: les Zrt-Irt like Proteins (ZIP), les Cation Diffusion Facilitators (CDF, facilitateurs de diffusion de cations) et les Divalent Metal Transporters (DMT, transporteurs de métal divalent) (Colvin *et al.*, 2003; Colvin *et al.*, 2008; Sensi *et al.*, 2009; Pitt et Stewart; 2015).

- **ZIP** : localisés au niveau de la membrane plasmique, ils sont indépendants de l'ATP et sensibles au pH. Les ZIP seraient impliqués dans le transport du Zn^{2+} vers le cytosol et stimulés par l'augmentation de Zn^{2+} extracellulaire (Colvin et *al.*, 2003).
- **CDF** : il s'agit d'une famille de transporteurs de Zn^{2+} (ZnT) pouvant jouer des rôles variés dépendant du type concerné. ZnT1 serait ubiquitaire et majoritairement localisé au niveau de la membrane plasmique où il participerait à l'extrusion de Zn^{2+} vers le milieu extracellulaire. Les transporteurs ZnT2 à ZnT7 seraient plutôt situés dans les membranes des organelles intracellulaires (localisation spécifique à certains tissus biologiques) où ils permettraient la séquestration de Zn^{2+} dans les organelles cytoplasmiques (Colvin et *al.*, 2003).
- **DMT** : ce type de transporteur a été moins bien étudié que les ZIP et les CDF. En effet, la distribution phylogénétique des gènes codant pour les catégories DMT1/2 n'a pas été aussi largement investiguée que celle concernant les membres de la famille ZIP et CDF, bien que certains homologues (chez l'humain, le rat et la levure) ont été fonctionnellement caractérisés (Colvin et *al.*, 2003). Des évidences suggèrent que l'expression hétérologue de DMT1 dans des ovocytes de *X. laevis* générerait de grands courants entrants lorsque l'ion fer (Fe^{2+}) et plusieurs autres ions métalliques divalents incluant le Zn^{2+} étaient ajoutés au milieu extracellulaire (Colvin et *al.*, 2003). Toutefois, des études, n'ayant pas réussi à prouver le transport du Zn^{2+} par certains homologues de DMT dans des ovocytes de *X. laevis* (Colvin et *al.*, 2003), existent; rendant la littérature concernant ce transporteur quelque peu mitigée.

Il est important de souligner que les transporteurs ZnT1, ZnT5, ZIP1 et ZIP7 ont également été identifiés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (ER), suggérant un flux probable de Zn^{2+} provenant du cytosol. Par extrapolation, ces transporteurs pourraient également être présents dans la membrane du SR des fibres musculaires, ajoutant des évidences à l'hypothèse selon laquelle un réservoir de Zn^{2+} existerait dans le SR (Palmer et *al.*, 2006).

En outre, plusieurs protéines de liaison et transporteurs participent à l'homéostasie du Zn^{2+} dans le cerveau. Cependant, certaines interrogations demeurent. Considérant l'équivalence entre les concentrations en Zn^{2+} libre (de l'ordre du nanomolaire) dans les milieux intracellulaire ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) et extracellulaire ($[\text{Zn}^{2+}]_e$) (Colvin *et al.*, 2003), la force électromotrice résultante (driving force) du Zn^{2+} serait donc uniquement corrélée au voltage (se référer à Clay, 2009 pour plus d'informations concernant les fondements électrophysiologiques de cette affirmation). A une valeur de voltage égale au potentiel de repos de la membrane, la force électromotrice provoquerait ainsi un flux de Zn^{2+} dirigé vers l'intérieur de la cellule (l'inverse serait vrai lorsque la cellule est dépolarisée). Par ailleurs, les ZIP, CDF et DMT semblent tous les trois représenter du transport passif, or, il devrait forcément y avoir un type de transport actif (membranaire ou intracellulaire) permettant de maintenir cet équilibre et d'acheminer le Zn^{2+} soit en dehors de la cellule ou dans des organelles intracellulaires; permettant ainsi de contre balancer sa force électromotrice. A défaut, la $[\text{Zn}^{2+}]_i$ aurait été plus importante que la $[\text{Zn}^{2+}]_e$, contrairement à ce qui a été mesuré dans la littérature (Colvin *et al.*, 2003). Par ailleurs, il est important de noter que le Zn^{2+} aurait également la capacité d'être transporté via des canaux ioniques, transporteurs et pompes associées au Ca^{2+} (Pitt et Stewart, 2015).

Choix des tissus biologiques à analyser (cerveau)

Le manque de régulation adéquat des concentrations en calcium (Sensi *et al.*, 2009; Hyrc *et al.*, 1997; Galluzzi *et al.*, 2009; Szydlowska et Tymianski, 2010; Benveniste *et al.*, 1988; Paschen, 1996; Perez Velazquez *et al.*, 1997; Nishizawa, 2001; Fernyhough et Calcutt, 2010; Gareri *et al.*, 1995) et en zinc (Sensi *et al.*, 2009; Frederickson *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2008; Tonder *et al.*, 1990; Koh *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2000; Aizenman *et al.*, 2000; Stork et Li, 2006; Dittmer *et al.*, 2009; Smart *et al.*, 2004; Medvedeva *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2001; Bossy-Wetzel *et al.*, 2004; Sensi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002) a des implications majeures en pathophysiologie nerveuse. Par exemple, le Ca^{2+} serait impliqué dans la mort excitotoxique des neurones (Hyrc *et al.*, 1997) tandis que le Zn^{2+} jouerait un rôle dans l'induction de l'apoptose des cellules neuronales (via le stress oxydatif: Aizenman *et al.*, 2000; via la libération de peptides pro-apoptotiques par les mitochondries des cellules nerveuses: Jiang *et al.*, 2001);

en plus de la probable capacité du divalent à provoquer des défaillances synaptiques (Medvedeva et *al.*, 2009).

Par ailleurs, la littérature portant sur l'étude du zinc dans le cerveau (Sensi et *al.*, 2009) est beaucoup plus avancée que celle portant sur le muscle squelettique.

Notre étude porte sur 5 régions du cerveau qui sont toutes affectées à divers degrés lors du vieillissement et très probablement chez les patients atteints d'AD ou de HD (Lessard-Beaudoin et *al.*, 2015; Cerbai et *al.*, 2012; Dorszewka et *al.*, 2004; Zhang et *al.*, 1995), l'objectif étant de déterminer spécifiquement si le vieillissement pourrait avoir des impacts sur les niveaux de $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ mesurés.

Maladies d'Alzheimer et de Huntington

Maladie d'Alzheimer (AD) : consiste en une « dégénérescence des tissus de l'encéphale qui conduit à la démence. AD se caractérise par une perte de mémoire ou amnésie, la réduction de la durée de l'attention et la désorientation ». Dans les derniers stades de la maladie, on observe parfois « la perte de plusieurs autres fonctions et les malades deviennent incapables de parler (aphasie), d'exécuter des mouvements volontaires précis (apraxie) ou de reconnaître les objets (agnosie)» (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 12 : Le système nerveux central, page 543).

AD est fortement associé à une dérégulation de l'homéostasie du Ca^{2+} (Demuro et *al.*, 2010; Woods et Padmanabhan, 2012). Aussi, une des caractéristiques d'AD est la production excessive de β -amyloïde (ou A β , obtenu par le clivage protéolytique de la protéine précurseur de l'amyloïde) et son accumulation massive dans les plaques amyloïdes (Demuro et *al.*, 2010). Des évidences basées sur des études d'imagerie suggèrent que les dépôts de plaques A β provoqueraient une dérégulation de l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire (notamment une surcharge calcique) dans les cellules neuronales et gliales (Demuro et *al.*, 2010, Kuchibhotla et *al.*, 2008; Kuchibhotla et *al.*, 2009) ainsi qu'une dégradation structurelle des processus dendritiques dans les stades ultérieurs de la pathologie (Demuro et *al.*, 2010; Tsai et *al.*, 2004).

Le Zn^{2+} est identifié dans la littérature comme étant très probablement une puissante toxine impliquée dans la mort des cellules neuronales et gliales (Sensi *et al.*, 2009). Le divalent serait également associé à diverses pathologies comme l'épilepsie, l'ischémie et le traumatisme cérébral (Sensi *et al.*, 2009; Frederickson *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2008; Tonder *et al.*, 1990; Koh *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2000; Aizenman *et al.*, 2000). Associé à la dérégulation de l'homéostasie du Ca^{2+} , un rôle majeur du Zn^{2+} a été proposé dans la neurodégénération liée à AD. Par exemple, l'A β dispose de sites de liaison au Zn^{2+} et les ions Zn^{2+} sont les seuls ions métalliques physiologiquement disponibles pour précipiter l'A β à pH 7,4 (Zhang *et al.*, 2008; Bush *et al.*, 1994a). De plus, un dépôt d'A β peut être déclenché par l'augmentation de Zn^{2+} dans le cerveau, entraînant ainsi la formation de plaques séniles (Zhang *et al.*, 2008; Bush *et al.*, 1994b). Par ailleurs, l'expression de certains transporteurs de Zn^{2+} est modulée au voisinage de plaques A β séniles dans les modèles de souris atteintes d'AD de même que chez des patients diagnostiqués d'AD, indiquant que l'homéostasie du Zn^{2+} est perturbée localement (Sensi *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). Dans un essai pilote de phase II, le taux de déclin cognitif de même que les niveaux plasmatiques des plaques amyloïdes β_{42} de patients atteints d'AD (stades modéré à sévère) ont été réduits par l'administration orale de clioquinol (chélateur de Zn^{2+}) pendant 36 semaines (Sensi *et al.*, 2009; Ritchie *et al.*, 2003).

Maladie d'Huntington (HD) : il s'agit d'une pathologie qui entraîne une dégénérescence des noyaux basaux puis du cortex cérébral. Dans les stades précoces de la maladie, les patients effectuent des « mouvements désordonnés saccadés presque continuels dont l'amplitude augmente avec le temps » (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 12 : Le système nerveux central, page 544).

Des évidences scientifiques associent la pathogénèse précoce de plusieurs troubles neurodégénératifs; incluant AD, HD et la maladie de Parkinson; à la dérégulation de l'homéostasie du Ca^{2+} et la dysfonction synaptique (Raymond, 2017; Brose *et al.*, 2010; Forero *et al.*, 2006; Milnerwood et Raymond, 2010; Nithianantharajah et Hannan, 2013; Schirinzi *et al.*, 2016). Aussi, une accumulation neurotoxique de Zn^{2+} a été décelée dans des modèles animaux atteints de HD (Sheline *et al.* 2012).

Par ailleurs, malgré l'implication probable des ions Ca^{2+} et Zn^{2+} dans AD et HD, il est important de noter que notre étude ne portera pas directement sur les modèles animaux atteints de ces pathologies mais plutôt sur les effets que l'âge pourrait avoir sur les concentrations totales en calcium et en zinc dans certaines régions du cerveau de souris (C57BL/6); AD et HD étant des maladies neurodégénératives associées au vieillissement (Smith et *al.*, 2006; Raymond, 2017). Un des objectifs de notre étude portera sur la mesure des contenus totaux en calcium et en zinc dans des régions spécifiques du cerveau, considérant un groupe de souris relativement plus âgées comparativement à un groupe contrôle; permettant ainsi de déceler les éventuelles disparités pouvant exister dans la distribution de ces divalents.

Régions du cerveau analysées

Les 5 régions du cerveau étudiées sont les suivantes :

Les bulbes olfactifs : responsables de la transmission de l'information olfactive du nez vers d'autres structures du cerveau. Chez le mammifère, la voie olfactive se compose de quatre structures principales: la muqueuse olfactive dans la cavité nasale, les nerfs olfactifs, le bulbe olfactif et le tractus olfactif latéral (Shepherd, 1972). Les récepteurs olfactifs de la muqueuse donnent naissance aux nerfs olfactifs, réunis en faisceaux et se terminant dans le bulbe olfactif (Shepherd, 1972). Ainsi, le bulbe olfactif est le premier centre de relais synaptique dans la voie olfactive. Les principaux neurones relais du bulbe olfactif envoient leurs axones, à travers le tractus olfactif latéral, se projeter dans plusieurs parties du télencéphale (Shepherd, 1972). Le tractus olfactif latéral projette principalement sur le cortex prépiriforme où les fibres établissent des connexions synaptiques axodendritiques avec les dendrites apicales des neurones pyramidaux corticaux (Shepherd, 1972). Outre le cortex prépiriforme, le tractus olfactif latéral présente également d'importantes projections sur le noyau olfactif antérieur, le tubercule olfactif et les régions amygdaloïdes (Shepherd, 1972).

Les bulbes olfactifs jouent un rôle primordial dans la cascade de transmission aboutissant à l'interprétation et l'identification consciente des odeurs de même que dans la génération de réactions émotives liées aux odeurs identifiées (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 15: Les sens, pages 667-668). Par exemple, des réactions de fuite ou de lutte peuvent être

déclenchées par le système nerveux sympathique grâce à l'acheminement des influx vers d'autres régions du système limbique (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 15: Les sens, page 668).

Le système olfactif a longtemps été considéré comme modèle pour étudier le développement, la maintenance et la dégénérescence des neurones chez les mammifères pour plusieurs raisons. Par exemple, des différences subtiles dans les changements cellulaires sont facilement discernables car le bulbe olfactif et les centres supérieurs tels que le noyau olfactif antérieur et le cortex olfactif primaire (piriforme) possèdent tous un nombre limité de types de cellules disposées de façon régulière et laminaire (Mirich et *al.*, 2002). Aussi, un nombre important d'études chez l'homme suggère que les déficits olfactifs fonctionnels augmentent avec l'âge et les maladies liées à l'âge (Mirich et *al.*, 2002; Schiffman et Leffingwell, 1981; Ship et Weiffenbach, 1993; Nordin et *al.*, 1996; Moberg et Raz, 1997; Hoffman et *al.*, 1998; Hummel et *al.*, 1998; Larsson et Backman, 1998; Murphy et *al.*, 1998; Geisler et *al.*, 1999; Lehrner et *al.*, 1999; Rolls, 1999).

Le cortex cérébral : « siège de l'esprit conscient », indispensable à la communication, la mémorisation, la compréhension et à l'exécution de mouvements volontaires. « Le cortex cérébral renferme trois types de régions fonctionnelles : les régions motrices, les régions sensibles et les régions associatives » (par exemple : le cortex gustatif, le cortex visuel primaire ou encore le cortex auditif primaire) (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 12 : Le système nerveux central, page 506).

S'agissant du cortex cérébral, le vieillissement est notamment associé à une diminution du nombre de neurones (Dorszewka et *al.*, 2004; Yamada et *al.*, 1996), à des niveaux élevés de fragmentation de l'ADN chez des rats âgés (Dorszewka et *al.*, 2004; White et Barone, 2001) et à une réduction du volume de cette région spécifique du cerveau (Walhovd et *al.*, 2011). Aussi, une augmentation significative de certains transporteurs de Zn^{2+} a été décelée dans le cortex cérébral en utilisant un modèle murin atteint d'AD (Zhang et *al.*, 2008).

Le striatum (ou corps strié): élément des ganglions de la base (ou noyaux basaux) impliqués dans des fonctions motrices et dans l'apprentissage. Les noyaux de la base reçoivent des informations sensorielles et produisent des messages nerveux sortants. Étant

« en communication avec le cortex prémoteur et le cortex préfrontal, ils influent ainsi sur les mouvements musculaires dirigés par le cortex moteur primaire ». Les noyaux basaux ont la capacité d'inhiber les mouvements antagonistes ou superflus et leur atteinte provoque également la « création de mouvements dans les maladies hypercinétiques (chorée de Huntington) » (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 12 : Le système nerveux central, page 512). La fréquence des cellules apoptotiques augmenterait significativement dans le striatum des rats âgés, impliquant une accélération du processus d'apoptose (Zhang et *al.*, 1995). De plus, le vieillissement a notamment été associé à une réduction du nombre de neurones (Dorszewka et *al.*, 2004; Yamada et *al.*, 1996) et à une diminution du volume du striatum (Lessard-Beaudoin et *al.*, 2015; Walhovd et *al.*, 2011).

L'hippocampe : joue un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire et représente, avec le télencéphale ventral, les régions les plus touchées chez les patients atteints d'AD (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 11: Le système nerveux : notions de base, page 454). Des évidences suggèrent une diminution de la taille des astrocytes dans certaines régions de l'hippocampe de rats âgés comparativement aux rats contrôles, avec des embranchements plus épais, plus courts et moins nombreux (Cerbai et *al.*, 2012). Une infiltration des neurones apoptotiques par des embranchements astrocytaires a également été décelée chez des rats âgés (Cerbai et *al.*, 2012). De plus, des débris cellulaires (plus nombreux chez les rats âgés) seraient apposés aux processus astrocytaires et phagocytés par la microglie réactive (Cerbai et *al.*, 2012). La microglie réactive serait présente dans certaines régions de l'hippocampe, souvent associées avec des cellules apoptotiques (Cerbai et *al.*, 2012). Des différences significatives ont été trouvées dans la proportion de microglie réactive chez les rats âgés comparativement aux rats contrôles (Cerbai et *al.*, 2012). De même, le nombre de neurones (Cerbai et *al.*, 2012) ainsi que le volume de l'hippocampe (Lessard-Beaudoin et *al.*, 2015) auraient également diminué chez les animaux âgés. Par ailleurs, des niveaux élevés de fragmentation d'ADN ont été mesurés dans l'hippocampe de rats âgés (White et Barone, 2001).

Le cervelet : impliqué dans la coordination, la synchronisation des mouvements, l'équilibre et la posture. « Le cervelet traite les informations sensorielles reçues des régions motrices, de divers noyaux du tronc cérébral et de plusieurs récepteurs sensoriels. Il synchronise les contractions des muscles squelettiques et produit ainsi des mouvements coordonnés » (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 12: Le système nerveux central, pages 523-526).

Dans le cervelet, le vieillissement a été associé à une diminution du nombre de neurones (de 25% à 38%) (Rogers et *al.*, 1984; Dorszewka et *al.*, 2004), du nombre de synapses (Chen et Hillman, 1999; Dorszewka et *al.*, 2004), de la longueur des projections neuronales (Huang et *al.*, 1999; Dorszewka et *al.*, 2004) ainsi qu'à des niveaux élevés de fragmentation de l'ADN chez les rats âgés (White et Barone, 2001; Dorszewka et *al.*, 2004).

En conclusion, l'homéostasie du Ca^{2+} reste critique autant dans les muscles squelettiques que dans le cerveau. S'agissant du Zn^{2+} , ses implications physiologiques et pathophysiologiques probables ont été décrites de manière beaucoup plus détaillée dans le cerveau comparativement aux muscles squelettiques. La dérégulation de l'homéostasie du Ca^{2+} et du Zn^{2+} serait un mécanisme majeur décelé lors de l'occurrence d'AD et de HD. Notre projet de recherche s'est donc intéressé à la mesure des concentrations totales de ces deux divalents avec l'objectif principal de tenter d'apporter certains éléments de réponse liés à leur distribution tissulaire et ultimement la pertinence de celle-ci en physiologie musculaire et nerveuse.

Hypothèses de la recherche

➤ Hypothèse 1 : muscles squelettiques

Nous émettons l'hypothèse que des $[Zn_T]$ non négligeables seront mesurées dans les muscles squelettiques de souris avec des valeurs significativement plus élevées dans le soleus comparativement à l'EDL. En effet, les expériences de Qian et Colvin, 2015, effectuées chez le rat, seront répétées chez la souris en utilisant la méthode nouvellement développée par notre laboratoire (se référer à la sous-section « Limites » de la section « Méthode BAPTA » pour plus d'informations).

➤ Hypothèse 2 : régions du cerveau étudiées

Malgré les similitudes qui semblent exister entre le Ca^{2+} et le Zn^{2+} dans le muscle squelettique en termes de signaux myoplasmiques mesurés relativement aux courants respectifs de ces divalents de même qu'en termes de stockage et de libération; ces deux ions ont des implications physiologiques différentes dans le cerveau. Notre hypothèse est que ce phénomène se traduira par des valeurs de $[Ca_T]$ et de $[Zn_T]$ variables dépendant des régions étudiées et des rôles physiologiques présumés de ces divalents autant en condition contrôle qu'en condition de vieillissement (se référer à la section « Application au cerveau » pour plus de détails).

Objectifs

Objectif #1

Développer et fiabiliser une méthode permettant la mesure individuelle de $[Ca_T]$ et de $[Zn_T]$ lorsque les deux divalents sont présents de manière simultanée dans un échantillon de tissu biologique.

Objectif #2

Mesurer $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ dans les régions du cerveau étudiées de même que dans les muscles squelettiques analysés.

Objectif #3

Mesure des mêmes divalents en conditions pathophysiologiques (AD, HD). Ces mesures n'ont pas pu être effectuées dans le cadre du projet et seront évoquées dans les perspectives.

Objectif #4

Étudier les mécanismes de régulation du Ca^{2+} et du Zn^{2+} , plus particulièrement l'origine, la localisation et les rôles du Zn^{2+} dans les muscles squelettiques analysés. En raison de sa complexité, cette étude n'a pas été menée dans notre projet. Il en sera fait mention dans les perspectives.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Une description du protocole publié dans Lamboley *et al.*, 2015 sera effectuée dans les prochains paragraphes. En effet, ce protocole se subdivise en trois parties : la préparation de l'échantillon de tissu, les mesures d'absorbance et l'analyse des données obtenues. La section « Résultats » comportera toutes les améliorations qui ont été apportées au protocole de Lamboley *et al.*, 2015 et décrira de manière détaillée le nouveau protocole mis en place de même que l'usage qui en a été fait pour analyser les tissus biologiques d'intérêt.

Préparation des échantillons

En prenant l'exemple de la souris, l'animal fût euthanasié et une extraction minutieuse des muscles squelettiques entiers (d'un tendon à l'autre) était réalisée (EDL et soleus). Par la suite, chaque muscle était pesé (le poids moyen était d'environ 10 mg), introduit individuellement dans un tube centrifuge (Eppendorf) de 1,5 mL et congelé (à -21 °C) pour conservation et analyse ultérieure (l'utilisation de tissu vivant n'est pas nécessaire).

Aux fins d'analyse, les muscles étaient d'abord sortis à température ambiante le temps de décongeler et 200 µL d'une solution de mesure (Measurement Solution, MS) de même que 0,5 % (poids/volume) du détergent SDS étaient ajoutés individuellement à chaque tube centrifuge. La MS était composée de 0,15 mM BAPTA, 120 mM KCl, 2 mM HEPES et titrée à pH 8. Le SDS était incorporé afin de perméabiliser les membranes et dénaturer les protéines avec comme objectif de libérer tout le Ca^{2+} pour qu'il puisse se lier BAPTA. La solution de mesure (MS), dont la composition a été précédemment mentionnée, a uniquement été utilisée dans les expériences de Lamboley *et al.*, 2015. En effet, cette solution a été quelque peu adaptée dans le cadre de la méthode développée dans la présente étude (plus de détails seront donnés dans la section « Développement de la nouvelle méthode »).

Le muscle était ensuite homogénéisé directement dans le tube centrifuge grâce à un broyeur de tissu manuel. Par la suite, 1 mL de MS était rajouté au muscle homogénéisé (volume final d'environ 1,2 mL) et le tube était pesé afin de déterminer de manière exacte le

volume de solution rajouté (par la différence de poids mesurée). Finalement, les échantillons étaient centrifugés pendant 45 mn à une vitesse de 14000 rpm et une température de 6 °C. Le surnageant (composé de la MS, du BAPTA, des ions liés de même que certains composants intrinsèques du muscle tels que des protéines et acides aminés; se référer à figure 2 de Lamboley *et al.*, 2015 pour de plus amples renseignements) était récupéré et transféré dans un autre tube centrifuge pour analyse.

Mesures d'absorbances du BAPTA

Les mesures d'absorbances étaient individuellement réalisées (une mesure d'absorbance était effectuée tous les 2 nm entre 250 et 340 nm; donc à 250 nm, 252 nm, 254 nm et ainsi de suite jusqu'à 340 nm) en utilisant un spectrophotomètre (à température ambiante).

Le calcul de la $[Ca_T]$ relative à chaque échantillon est effectué avec la mesure d'absorbance du BAPTA obtenue à 292 nm. La visualisation de l'ensemble du spectre d'absorbance permet de déceler d'éventuels problèmes ayant pu avoir lieu durant les analyses.

D'abord, 0,45 mL de surnageant (préalablement récupéré) était introduit dans une cuvette de quartz (la même cuvette est utilisée pour tous les échantillons) suivi de la mesure du spectre d'absorbance du BAPTA correspondant (nommé A_M). Après l'ajout de 9 μ L d'une solution de 50 mM d'EGTA au surnageant, l'absorbance nommée A_0 (relative à la présence simultanée de BAPTA et d'EGTA dans l'échantillon) était ensuite déterminée. Le changement d'absorbance du BAPTA occasionné correspond à la capture de l'ensemble du Ca^{2+} initialement lié au BAPTA par l'EGTA (la concentration finale en EGTA dans l'aliquote était de 1 mM).

La cuvette était nettoyée et 0,45 mL du même surnageant y était incorporé à nouveau. Par la suite, les absorbances du BAPTA appelées A_S puis A_∞ étaient déterminées, correspondant à l'ajout de 9 μ L de solutions standards contenant 1,75 mM de $CaCl_2$ et 50 mM de $CaCl_2$, respectivement. A_S représente l'ajout d'une concentration de 0,03 mM de calcium au surnageant (concentration typiquement mesurée dans un muscle squelettique) alors que A_∞ traduit l'incorporation de calcium en excès (concentration finale en calcium de 1 mM) dans l'aliquote A_S .

La différence $A_0 - A_M$ renseigne sur la quantité de calcium présente initialement dans l'échantillon alors que A_S et A_∞ servent à des fins de calibration. A chaque fois qu'une

solution (EGTA ou standards de CaCl_2) était rajoutée dans la cuvette contenant l'échantillon à analyser, un mélange manuel (en utilisant du film plastique de type Parafilm) était réalisé afin d'assurer une bonne diffusion des solutions ajoutées dans l'échantillon.

Par ailleurs, la quantité de Ca^{2+} présente dans la solution de mesure (avant tout contact avec le tissu biologique) est équivalente à la fraction de BAPTA liée à du Ca^{2+} dans le bruit de fond. Vu que ce calcium ne provient pas du tissu analysé, il doit être quantifié et soustrait de la valeur finale de $[\text{Ca}_T]$ mesurée. La détermination de la proportion de Ca^{2+} dans le bruit de fond passe par les mêmes étapes que celles mentionnées précédemment à l'exception du fait que le tissu biologique est absent de l'aliquote. En effet, uniquement la solution de mesure MS est analysée afin d'obtenir les absorbances du BAPTA: S_M , S_0 , S_S , et S_∞ correspondantes.

Par la suite, les spectres d'absorbances obtenus sont tracés en fonction de la longueur d'onde (nm). La Figure 1 représente un exemple de spectres d'absorbances typiquement obtenus lors des analyses; les sections A et B illustrant les spectres relatifs à l'analyse d'un échantillon de tissu biologique (ici un EDL de souris) alors que les sections C et D représentent uniquement l'analyse de la solution de mesure (détermination du Ca^{2+} présent dans le bruit de fond). Les spectres d'absorbances A_M , A_0 , A_S et A_∞ sont représentés à la section A tandis que la section B illustre les différences entre les spectres d'absorbances : $A_0 - A_M$, $A_M - A_S$ et $A_0 - A_\infty$. Tel qu'indiqué précédemment, la mesure la plus importante se fait à 292 nm (indiqué par les flèches). Les sections C (représentant les spectres d'absorbances S_M , S_0 , S_S , et S_∞) et D (représentant les différences de spectres d'absorbances : $S_0 - S_M$, $S_M - S_S$ et $S_0 - S_\infty$) illustrent les mêmes paramètres que les sections A et B, respectivement, sauf qu'aucun échantillon de muscle n'était présent (se référer aux Figures 3 et 4 de Lamboley *et al.*, 2015, pour de plus amples renseignements).

En comparant les tracés A et B à ceux représentés dans C et D, respectivement, il est possible de visualiser l'absorbance intrinsèque liée au tissu biologique. Aussi, la section D permet de remarquer une faible différence $S_0 - S_M$ (cercles rouges) correspondant au Ca^{2+} provenant du bruit de fond (solution de mesure).

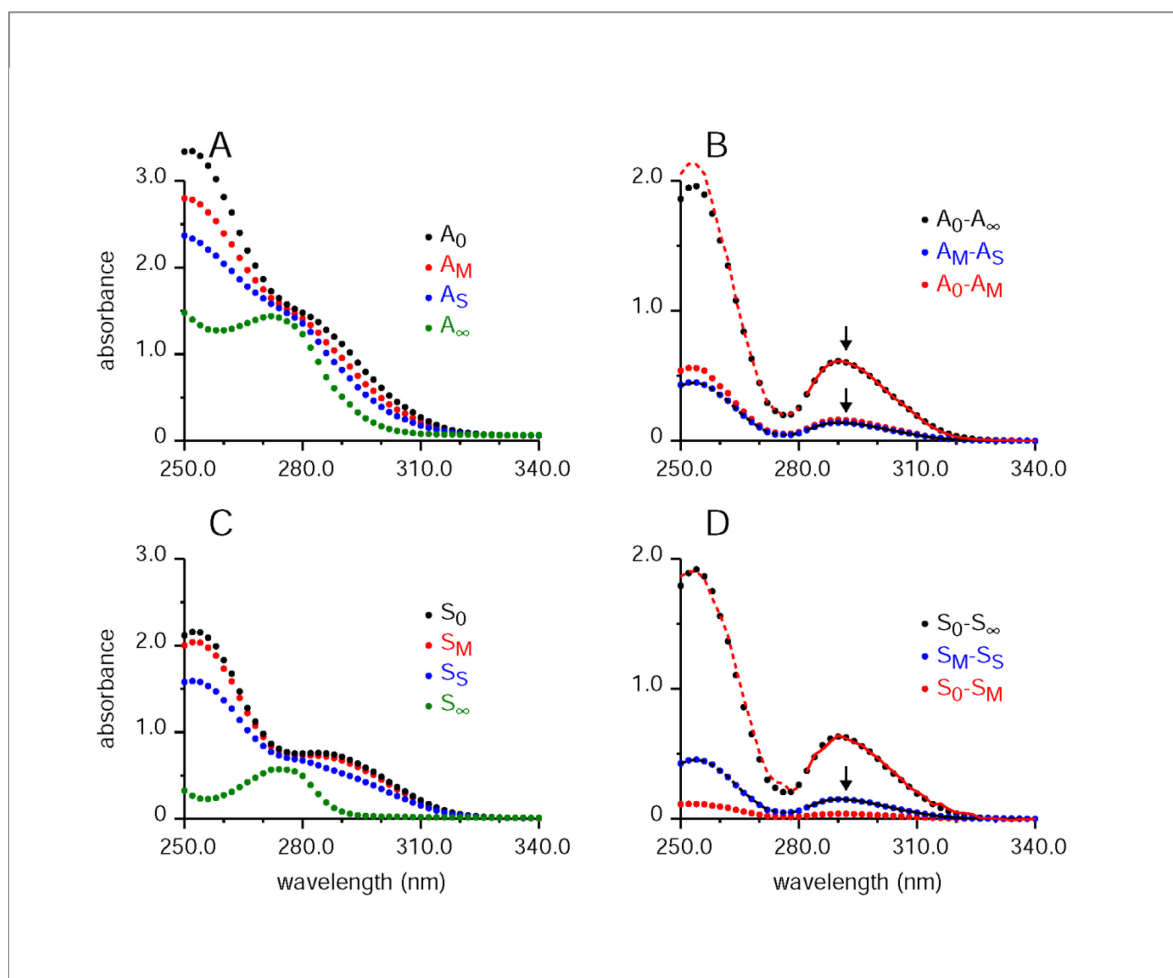


Figure 1 : Spectres d'absorbance du BAPTA durant l'analyse d'échantillons avec (A et B) et sans muscle présent (C et D)

Figure 1 : Spectres d'absorbances du BAPTA correspondant à un échantillon de muscle de type EDL (A et B) ainsi que les tracés relatifs à l'analyse d'un échantillon contenant uniquement la solution de mesure (C et D). Une concentration fixe de 0,15 mM de BAPTA est utilisée pour l'ensemble des résultats publiés dans Lamboley *et al.*, 2015 (incluant ceux associés à la Figure 1). A et B ont été obtenus avec un EDL de souris (9,8 mg) homogénéisé dans la solution de mesure (MS); donnant un volume final de 1,36 ml. La section A représente les spectres d'absorbance nommés A_M , A_0 , A_S et A_∞ . A_M correspond au spectre d'absorbances obtenu en analysant le surnageant récupéré après homogénéisation et centrifugation de l'échantillon de muscle. A_0 traduit le changement d'absorbance se produisant à l'ajout d'une concentration d'EGTA suffisante pour capturer tout le Ca^{2+}

initialement lié au BAPTA. A_S et A_∞ illustrent les spectres d'absorbances relatifs à l'ajout de solutions de concentrations connues en calcium; A_∞ représentant spécifiquement l'ajout de calcium en excès afin de saturer les sites de liaison du BAPTA. La section B permet de visualiser les spectres d'absorbances S_M , S_0 , S_S , et S_∞ ; obtenus de la même manière que les spectres d'absorbances A_M , A_0 , A_S et A_∞ ; respectivement, sauf qu'aucun muscle n'était présent. Les sections B et D représentent les différences entre les spectres d'absorbances $A_0 - A_M$, $A_M - A_S$, $A_0 - A_\infty$ et $S_0 - S_M$, $S_M - S_S$, $S_0 - S_\infty$, respectivement. Le calcul de la $[Ca_T]$ relative à chaque échantillon peut se faire uniquement avec les mesures obtenues à 292 nm (représenté par les flèches noires). Dans la section B, le tracé sous forme de ligne continue (rouge) représente un facteur d'échelle ayant pour objectif de minimiser la différence entre la somme des carrés relatifs aux données de $A_0 - A_M$ et $A_0 - A_\infty$ et ceci entre 282 et 340 nm. Les données obtenues pour les longueurs d'ondes inférieures à 282 nm sont traitées de la même manière, aboutissant au tracé en pointillés (rouge) de la même section (B). Les mêmes informations sont représentées à la section D sauf qu'aucun muscle n'est présent dans l'échantillon analysé (se référer aux figures 3 et 4 de Lamboley et *al.*, 2015 pour plus d'informations).

Analyse des données d'absorbances

Les spectres d'absorbance obtenus sont analysés grâce à la loi de Beer-Lambert. En effet, les absorbances A_M , A_0 , A_S , et A_∞ peuvent s'écrire, selon les équations 1, 2, 3 et 4, respectivement; comme suit :

$$A_M = A_{INTR} + \left\{ \varepsilon_{CaB} ([CaB]_M + [CaB]_{background}) + \varepsilon_B ([B_T] - [CaB]_M - [CaB]_{background}) \right\} \cdot l . \quad (1)$$

A_{INTR} étant l'absorbance intrinsèque de l'échantillon de tissu (absorbance non liée au BAPTA), l la longueur du chemin traversé par la lumière (1cm), ε_{CaB} et ε_B les coefficients d'extinction du BAPTA lié au Ca^{2+} et du BAPTA libre, $[CaB]_M$ et $[CaB]_{background}$ les concentrations du complexe Ca^{2+} -BAPTA dans le muscle et dans le bruit de fond de la solution de mesure, respectivement; et $[B_T]$ la concentration totale en BAPTA dans

l'échantillon considéré.

$$A_0 = A_{INTR} + \varepsilon_B [B_T] \cdot l \quad (2)$$

$$A_S = A_{INTR} + \left\{ \frac{\varepsilon_{CaB} ([CaB]_M + [CaB]_{background} + [CaB]_S) + \varepsilon_B ([B_T] - [CaB]_M - [CaB]_{background} - [CaB]_S)}{\varepsilon_B ([B_T] - [CaB]_M - [CaB]_{background} - [CaB]_S)} \right\} \cdot l \quad (3)$$

$[CaB]_S$ étant la concentration du complexe Ca^{2+} -BAPTA provenant du standard de calcium ajouté.

$$A_\infty = A_{INTR} + \varepsilon_{CaB} [B_T] \cdot l \quad (4)$$

En utilisant ces équations, il est possible de déduire la relation permettant de calculer la $[Ca_T]$ à partir de la concentration du complexe Ca^{2+} -BAPTA provenant du muscle $[CaB]_M$ (équation 16B de Lamboley *et al.*, 2015) :

$$[CaB]_M = \left[(A_M - A_0) - (S_M - S_0) \left(\frac{A_\infty - A_0}{S_\infty - S_0} \right) \right] \left(\frac{1}{\Delta\varepsilon \cdot l} \right) \quad (5)$$

Avec $\Delta\varepsilon \equiv \varepsilon_{CaB} - \varepsilon_B$

La $[CaB]_M$ (à 292 nm) est obtenue en faisant la différence entre la valeur de calcium total mesurée, proportionnelle à l'entité $A_0 - A_M$, et la composante de calcium total relative au bruit de fond donnée par le facteur $S_0 - S_M$. La valeur de $(A_\infty - A_0)/(S_\infty - S_0)$, prenant en compte la faible différence de concentration totale en BAPTA selon que le tissu soit présent ou absent, est proche de 1 (se référer à Lamboley *et al.*, 2015 pour plus d'informations).

La différence $A_\infty - A_0$ représente le changement d'absorbance mesuré lorsque tous les sites de liaison du BAPTA sont libres (A_0) comparativement à une situation dans laquelle tous les sites de liaison du BAPTA sont occupés par du Ca^{2+} en excès (A_∞). Ce paramètre est notamment impliqué dans le calcul expérimental de la concentration totale en BAPTA dans l'échantillon de muscle ($[B_T]$). La différence correspondant à l'analyse de l'échantillon sans muscle présent (MS) est représentée par $S_\infty - S_0$. La valeur de $[B_T]$ calculée de manière expérimentale peut être comparée à celle initialement introduite dans l'échantillon

(concentration nominale en BAPTA) à des fins de calibration de la méthode. Il est important de souligner que la valeur de $[B_T]$ est calculée en se basant sur l'ensemble du spectre d'absorbances mesuré et non juste sur une mesure unique (à 292 nm).

Dans les prochaines sections, toutes les étapes ayant mené au développement de la nouvelle méthode (basée sur celle de Lamboley et *al.*, 2015) de même que l'analyse des échantillons de tissus biologiques seront décrites.

RÉSULTATS

Développement de la nouvelle méthode

Dans cette section, une attention particulière sera portée aux différentes étapes ayant mené au développement du nouveau protocole, notamment à travers la résolution de différents problèmes rencontrés et l'introduction du TPEN.

Résolution de problèmes

Après la publication de Lamboley *et al.*, 2015, notre laboratoire a souhaité appliquer le protocole préalablement développé par les auteurs à un lecteur de plaques avec l'utilisation de plaques de mesures comportant 96 puits pouvant être assimilés à des cuvettes individuelles. Au lieu d'utiliser et de nettoyer la même cuvette en quartz à chaque fois, 2 puits successifs peuvent être utilisés pour chaque échantillon de tissu à analyser (le premier puits pour les absorbances A_M et A_0 , le deuxième pour A_S et A_∞). La portée d'une telle adaptation méthodologique serait donc conséquente s'agissant du nombre d'échantillons analysables à la fois et du gain de temps associé. Le mode de mélange manuel préalablement utilisé a également été remplacé par un mélange automatique de 10 s réalisé par l'appareil.

Toutefois, le passage au lecteur de plaques a été accompagné d'une succession d'évènements imprévus, incluant l'obtention de résultats significativement différents en comparant un échantillon de muscle squelettique d'un côté de l'animal (par exemple: l'EDL) par rapport au même muscle du côté opposé (expériences paires) ou encore une grande variabilité des données obtenues en mesurant des solutions avec des concentrations en calcium identiques. En résumé, les résultats déterminés avec le lecteur de plaques étaient globalement incohérents et l'origine de ce dysfonctionnement était inconnue. Toute une série d'expériences a donc été réalisée afin d'identifier les causes sous-jacentes.

Calibration #1

Une première expérience de calibration a été effectuée avec comme objectif de déterminer la précision avec laquelle des solutions de concentrations connues en calcium pouvaient être mesurées au niveau du lecteur de plaques. En effet, des solutions contenant des concentrations croissantes de 0 à 0,3 mM de calcium ont été préparées et analysées (incrément de 0,002 mM entre 0 et 0,02 mM de calcium et incréments de 0,02 mM entre 0,02 mM et 0,3 mM de calcium), représentant un total de 25 échantillons de solutions.

La solution de mesure utilisée était composée de 0,2 mM BAPTA, 120 mM NaCl, 2 mM HEPES, 2 mM MgCl_2 et titrée à pH 8. Cette composition restera la même lors de toutes les expériences réalisées dans la suite de notre étude. Le NaCl, manifestant des propriétés de dissolution satisfaisantes dans la solution de mesure (MS), a remplacé le KCl qui créait un dépôt blanchâtre lors de la préparation de la solution (préalablement utilisé par Lamboley *et al.*, 2015). Par ailleurs, la parvalbumine, la troponine et la myosine, étant des protéines situées dans le cytosol de cellules musculaires, présentent des sites de liaison non sélectifs pour le Ca^{2+} et le Mg^{2+} (Lamboley *et al.*, 2015). Tel que suggéré par Lamboley *et al.*, 2015, 2 mM de MgCl_2 ont donc été rajoutés à la MS afin de réduire l'affinité apparente de ces sites pour le Ca^{2+} (saturation des sites de liaison disponibles par le Mg^{2+}), advenant que le phénomène de dénaturation occasionné par le SDS soit incomplet (cette possibilité étant assez peu probable, se référer au Tableau 2 de l'appendix de Lamboley *et al.*, 2015 et au texte associé). L'objectif ultime de cette manœuvre était de limiter autant que possible la liaison du Ca^{2+} à d'autres composés autres que le BAPTA dans les tissus biologiques d'intérêt. Aussi, nos expériences prouvent que le Mg^{2+} rajouté dans la MS n'interfère pas avec les mesures de $[\text{Ca}_T]$ et de $[\text{Zn}_T]$ (se référer aux Figures 5, 6, 12 et 13 de la présente étude de même qu'à la section « Discussion ») car, si tel était le cas, la précision des valeurs mesurées aurait été altérée.

La Figure 2 représente les $[\text{Ca}_T]$ mesurées en fonction des $[\text{Ca}_T]$ connues (concernant les solutions de concentrations croissantes en calcium dont le mode de préparation a été précédemment mentionné). La droite unitaire (orange) illustre la trajectoire sur laquelle les $[\text{Ca}_T]$ mesurées devraient être alignées. Force est de constater que les résultats obtenus (vert) ne correspondent pas à une méthode de mesure fiable et précise, notamment en raison de leur dispersion.

Lorsque la $[Ca_T]$ connue est égale à $[B_T]$, ici 0,2 mM (plus de détails seront donnés dans la prochaine section), un phénomène de saturation du BAPTA est détectable. Elle se caractérise par la limite que semblent dessiner les points associés à de hautes concentrations en calcium (supérieures à 0,2 mM).

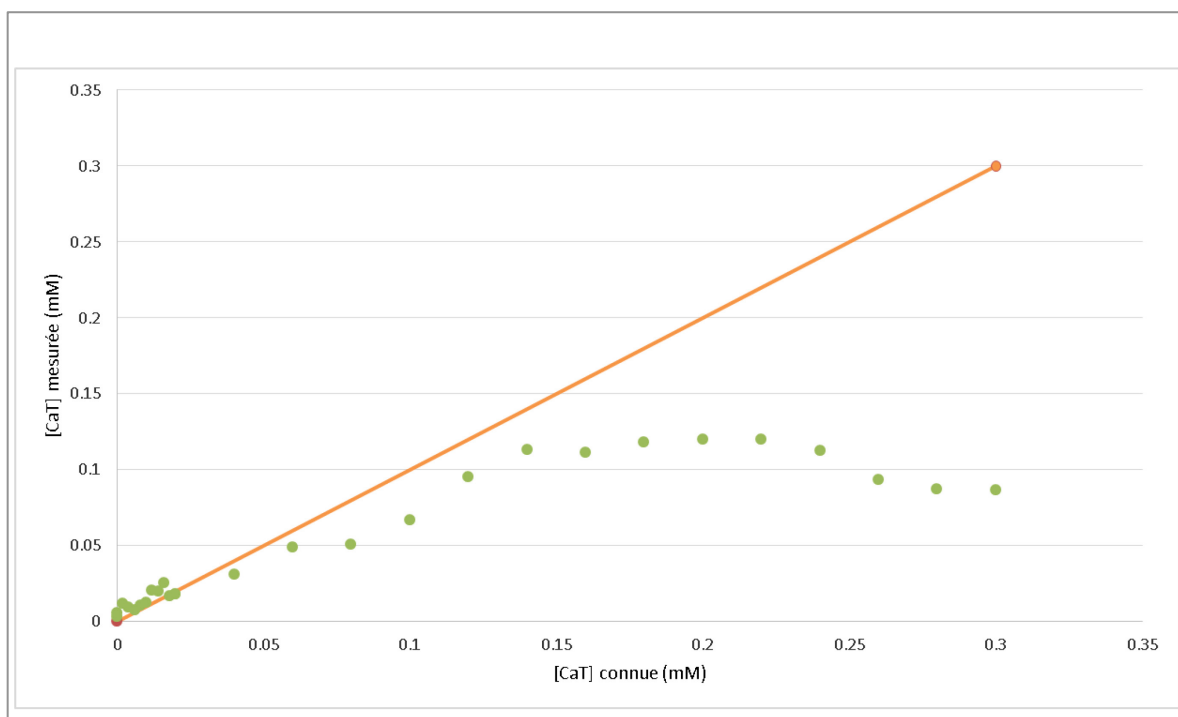


Figure 2 : Calibration #1, $[Ca_T]$ mesurées (mM) en fonction des $[Ca_T]$ connues

Figure 2 : $[Ca_T]$ mesurées en fonction des $[Ca_T]$ connues entre 0 et 0,3 mM de calcium. 25 solutions composées de concentrations croissantes en calcium ont été préparées (incrément de 0,002 mM entre 0 et 0,02 mM de calcium et incréments de 0,02 mM entre 0,02 mM et 0,3 mM de calcium) et mesurées afin d'analyser la précision avec laquelle ces concentrations pouvaient être déterminées en utilisant notre protocole. La droite (orange) représente la droite unitaire sur laquelle les points devraient être alignés. La dispersion manifeste des points mesurés traduit le manque de précision du protocole utilisant le lecteur de plaques.

Par la suite, il s'est agi de déterminer l'origine des déviations observées entre les concentrations connues et celles mesurées. Plusieurs stratégies ont été adoptées :

- Test des micropipettes utilisées pour préparer les solutions de calcium
- Répétitions de l'expérience de calibration
- Achat de nouvelles solutions standards de CaCl_2 (à partir desquelles les solutions de concentrations croissantes en calcium étaient préparées par dilution).

Malheureusement, aucune des stratégies mentionnées n'a permis d'identifier et de résoudre le problème rencontré.

Calcul expérimental de $[B_T]$

En poursuivant nos investigations, il a été possible de remarquer une contradiction entre les valeurs de $[B_T]$ calculées de manière expérimentale (qui variaient non seulement d'un échantillon à l'autre mais également en fonction du nombre d'étapes de mélange) et la $[B_T]$ nominale (restait toujours constante, égale à 0,2 mM). Nous nous sommes donc intéressés à la valeur de l'absorbance A_S permettant de calculer la $[B_T]$ (calibration) grâce à la formule suivante (dérivée des équations 1 à 4):

$$[B_T] = \frac{A_\infty - A_0}{A_S - A_M} [CaB]_s \quad (6)$$

En effet, la différence $A_S - A_M$ représente le changement d'absorbance occasionné lors de l'ajout de la solution standard en $CaCl_2$ (0,03 mM de calcium finale). Le fait que cette entité varie et donc que $[B_T]$ varie d'un échantillon à l'autre suggère que la quantité de standard de $CaCl_2$ (6 μ L) ajoutée d'un échantillon à l'autre serait différente, ce qui n'est pas le cas vu que le même volume de standard est rajouté à chaque fois dans les échantillons (avec une micropipette étalonnée). Par contre, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle le volume de standard ajouté n'est pas distribué de manière homogène dans tous les échantillons. Afin de tester cette hypothèse, des solutions de concentrations croissantes en calcium ont été préparées (même procédé que pour la calibration #1) et des étapes de mélange supplémentaires ont été insérées au protocole afin de calculer expérimentalement la $[B_T]$ correspondant à chaque stade de mélange.

Le protocole de départ est représenté par 10 s de mélange linéaire (condition 1). Des incréments de 10 s de mélanges supplémentaires sont rajoutés à chaque fois jusqu'à la condition 4. La condition 5 correspond à un mélange subséquent de 30 s tandis que la condition 6 est obtenue après 10 s supplémentaires de mélange orbital. Les mêmes étapes sont répétées pour obtenir les conditions 7 à 10.

Les types de mélanges (linéaire ou orbital) sont des paramètres automatiques réglables du lecteur de plaques.

Condition	Type de mélange
Condition 1	10 s linéaire
Condition 2	+ 10 s linéaire
Condition 3	+ 10 s linéaire
Condition 4	+ 10 s linéaire
Condition 5	+ 30 s linéaire
Condition 6	+ 10 s orbital
Condition 7	+ 10 s orbital
Condition 8	+ 10 s orbital
Condition 9	+ 10 s orbital
Condition 10	+ 30 s orbital

L'élément essentiel mis en exergue par cette expérience (Figure 3) est que la $[B_T]$ diminue progressivement en fonction du nombre d'étapes de mélange des échantillons analysés pour finalement se stabiliser au bout de 80 s de mélanges intermittents (condition 6), ce qui est paradoxal car la $[B_T]$ nominale reste invariable (0,2 mM).

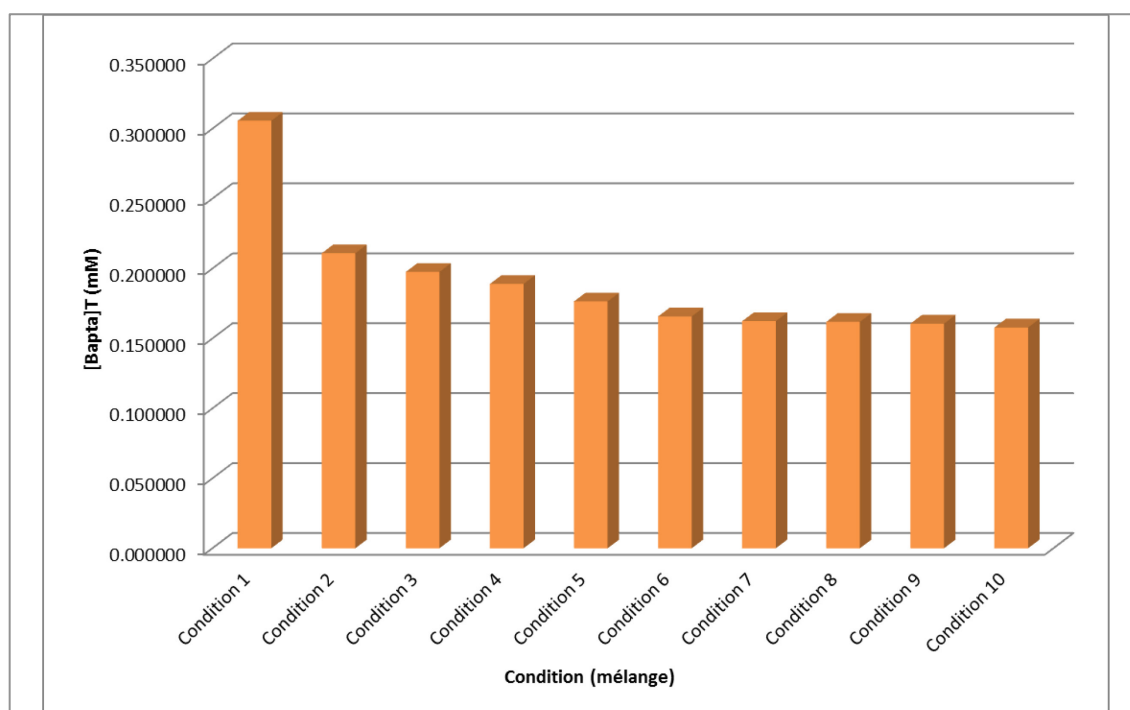


Figure 3 : Calibration #2, Moyennes de $[B_T]$ mesurées (mM) en fonction de la condition de mélange

Figure 3 : Les 25 échantillons de concentrations croissantes en calcium (préparation similaire à la calibration #1, Figure 2) ont été analysés pour chaque condition de mélange, les moyennes de $[B_T]$ obtenues étant représentées en ordonnée. Paradoxalement, la $[B_T]$ déterminée de manière expérimentale grâce à l'équation (6) ne concorde pas avec la $[B_T]$ nominale (invariable et indépendante du type de mélange) et diminue progressivement à chaque étape de mélange pour atteindre un seuil à la condition 6. Le degré de pureté du BAPTA (82,85 %) a également pu être déterminé grâce à cette expérience (se référer au texte associé pour plus de détails).

L'équation (6) implique une relation de proportionnalité inverse entre le changement d'absorbance lié à l'ajout du standard de CaCl_2 ($A_S - A_M$) et la valeur de $[\text{B}_T]$ déterminée de manière expérimentale. Le fait que la $[\text{B}_T]$ diminue en fonction de la condition de mélange traduit une augmentation de la valeur de $A_S - A_M$ qui lui est associée. Concrètement, ces données impliquent qu'à chaque étape de mélange, le BAPTA capture une fraction supplémentaire de Ca^{2+} provenant du standard préalablement incorporé (le standard est uniquement ajouté à la condition 1) et ceci jusqu'à ce que tout le Ca^{2+} du standard ait été lié par le BAPTA (à la condition 6). A ce stade, la différence $A_S - A_M$ devient constante de même que la $[\text{B}_T]$ qui lui est associée.

Il est donc possible de conclure à partir de ces résultats que le protocole de mélange tel qu'utilisé (équivalent à la condition 1 - 10 s) ne permet pas d'assurer une distribution homogène des solutions ajoutées dans les aliquotes (l'absorbance A_S étant la valeur la plus sensible en raison de la concentration en Ca^{2+} ajoutée, comparativement à $A_0 - 1 \text{ mM}$ d'EGTA et $A_\infty - 1 \text{ mM}$ de Ca^{2+}).

A partir de cette expérience, il est également possible de calculer le degré de pureté du BAPTA en utilisant la valeur de $[\text{B}_T]$ après stabilisation (condition 6) qui est de 0,1657 mM. Le BAPTA utilisé dans la présente étude a donc une pureté de 82,85 % ($100 \times 0,1657 / 0,2$), comparativement à celui utilisé dans Lamboley *et al.*, 2015 qui était pur à 85,00 %. Le manque de pureté de 100 % a été associé à la probable présence d'eau dans le BAPTA (Harrison et Bers, 1987).

Suite à cette expérience, une adaptation du protocole a été réalisée afin de permettre un mélange adéquat des différentes solutions ajoutées. En effet, deux stratégies ont été proposées: ajouter des étapes de mélange supplémentaires et doubler les volumes des solutions incorporées (Figure 4).

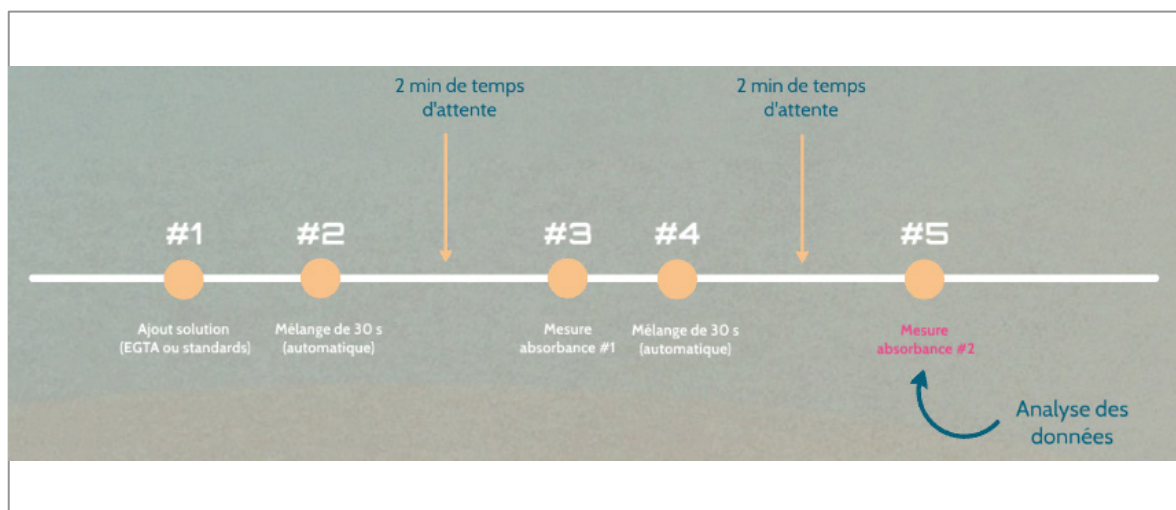


Figure 4 : Résolution du problème de mélange inadéquat

Figure 4 : Des étapes supplémentaires ont été ajoutées au protocole. Après incorporation des solutions d'intérêt (EGTA ou standards de CaCl_2 , étape #1), un mélange linéaire de 30 s est réalisé (#2) suivi d'un temps d'attente de 2 mn, avec l'objectif de privilégier une diffusion homogène des solutions dans les aliquotes. Une 1^{ère} mesure d'absorbance est ensuite effectuée (#3). Les étapes précédemment mentionnées sont répétées (mélange et temps d'attente supplémentaires, étape #4) et une 2^{ème} mesure d'absorbance est obtenue (#5). L'analyse des données s'effectue avec la 2^{ème} mesure d'absorbance, la 1^{ère} étant uniquement utilisée à des fins de comparaison (détermination de l'efficacité du protocole à l'étape #3).

Parallèlement à l'ajout d'étapes supplémentaires au protocole (Figure 4), le volume des solutions ajoutées a été doublé, passant ainsi à 12 μL , afin de s'assurer qu'une quantité adéquate de solution serait homogénéisée de manière satisfaisante avec les échantillons initialement présents dans les puits de la plaque. Les absorbances A_0 et A_∞ correspondent à présent à 2 mM d'EGTA et 2 mM de Ca^{2+} incorporés (concentration finale), respectivement. Cependant, la concentration de la solution de standard ajoutée pour la mesure de l'absorbance A_S a été divisée par 2 (0,75 mM) afin de ne pas impacter la $[\text{Ca}_T]$ incorporée. En effet, un volume de 6 μL d'une solution de 1,5 mM de CaCl_2 était initialement incorporé afin d'obtenir une $[\text{Ca}_T]$ finale rajoutée de 0,03 mM (concentration typiquement mesurée dans un muscle squelettique). Si ce volume est doublé à 12 μL , la

[Ca_T] finale dans l'échantillon serait de 0,06 mM au lieu de la concentration de 0,03 mM souhaitée. La concentration de la solution de standard de CaCl₂ a donc été divisée par deux (réduite à 0,75 mM) afin de compenser pour le volume ajouté (12 µL), permettant ultimement de conserver une [Ca_T] ajoutée de 0,03 mM.

Des expériences de calibration subséquentes ont été réalisées avec des solutions de concentrations croissantes en calcium (tel que mentionné précédemment) afin de valider ce protocole. Aussi, 25 autres solutions contenant des concentrations croissantes en zinc (en remplacement du calcium) ont été préparées d'une manière similaire aux échantillons relatifs au calcium (incréments de 0,002 mM entre 0 et 0,02 mM de zinc et incréments de 0,02 mM entre 0,02 mM et 0,3 mM de zinc) et mesurées afin d'évaluer certaines propriétés du zinc en solution lorsque le calcium est absent. Aucune modification n'a été apportée au protocole utilisé (Figure 4) lors des mesures d'absorbances liées au zinc (la mesure principale se faisant toujours à 292 nm selon la Figure 1).

Validation des adaptations au protocole et calcul des coefficients d'extinction

Les calibrations #3 et #4 représentent chacune l'analyse de 25 solutions de concentrations croissantes en calcium ou en zinc (se référer à la calibration #1 et la section précédente), respectivement, en prenant en compte les modifications préalablement apportées au protocole (Figure 4).

Les figures 5 et 6, associées aux calibrations #3 et #4, représentent les concentrations en calcium ou en zinc mesurées en fonction des concentrations en calcium ou en zinc connues, respectivement.

Ces données démontrent que les résultats incohérents initialement obtenus après le passage au lecteur de plaques découlaient du problème de mélange de l'échantillon préalablement identifié (Figure 3), maintenant corrigé (Figures 4, 5 et 6). Ces figures (5 et 6) prouvent également que le protocole utilisé est fiable, en raison de la très grande précision relative aux concentrations mesurées (incluant les valeurs de concentration les plus faibles).

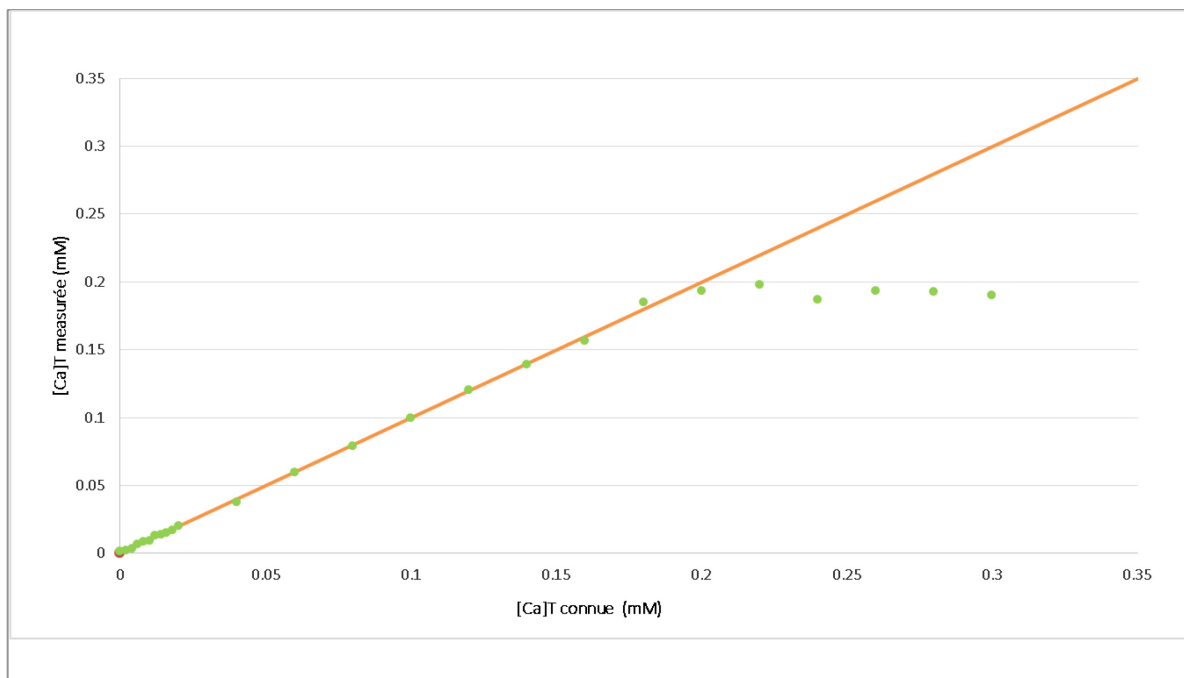


Figure 5 : Calibration #3, [Ca_T] mesurées (mM)

Figure 5 : [Ca_T] mesurées en fonction des [Ca_T] connues entre 0 et 0,3 mM de calcium. 25 solutions composées de concentrations croissantes en calcium ont été préparées (incrément de 0,002 mM entre 0 et 0,02 mM de calcium et incréments de 0,02 mM entre 0,02 mM et 0,3 mM de calcium) et mesurées afin de tester les modifications apportées au protocole (Figure 4) à la suite de l'identification du problème de mélange inadéquat des échantillons (Figure 3) lorsque les différentes solutions étaient rajoutées. La droite (orange) représente la droite unité. Le protocole permet à présent de mesurer de manière précise les [Ca_T] connues et ce jusqu'à 0,2 mM de calcium, concentration à laquelle tous les sites de liaison du BAPTA sont saturés par le calcium.

Comme pour la calibration #1, le BAPTA sature aux alentours de 0,2 mM calcium, expliquant ainsi l'allure des points à partir de cette concentration.

Une augmentation de la [B_T] nominale serait envisageable pour pouvoir mesurer des concentrations en calcium ou en zinc plus élevées. Cependant, la [B_T] utilisée dans la présente étude (0,2 mM) semble suffisante pour couvrir de manière satisfaisante l'intervalle associé aux valeurs de [Ca_T] et de [Zn_T] déterminées et s'avère donc adéquate.

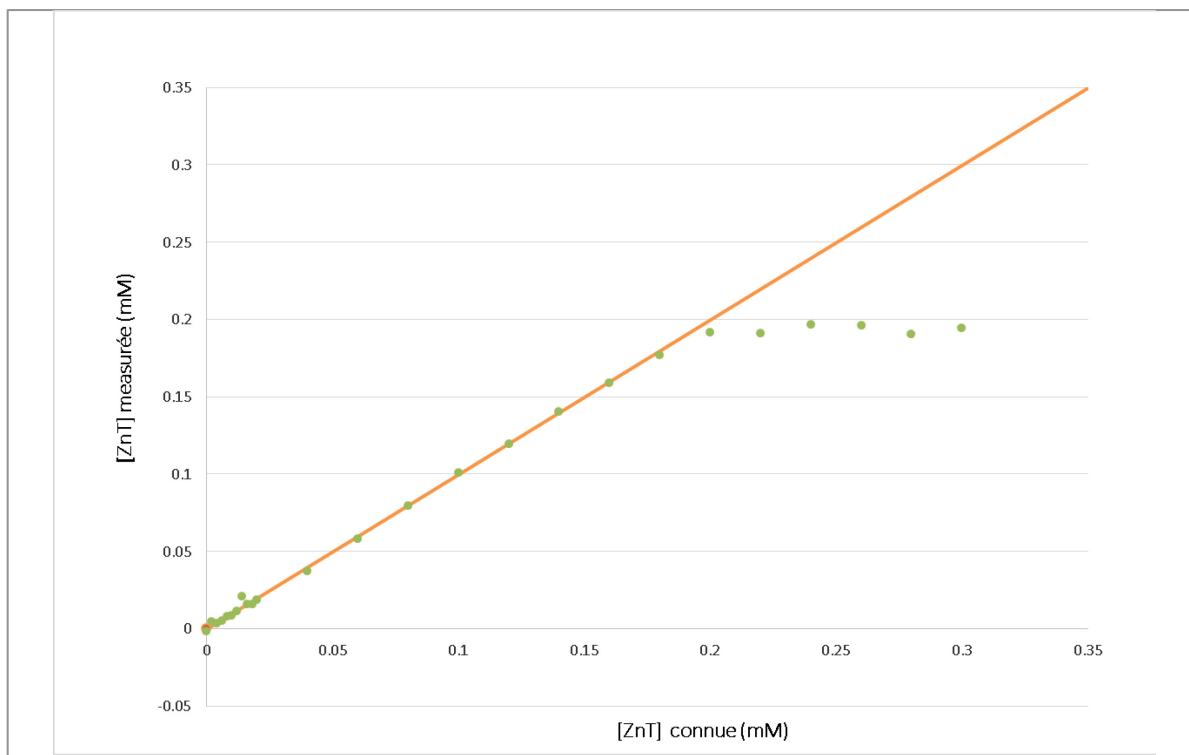


Figure 6 : Calibration #4, [Zn_T] mesurées (mM)

Figure 6 : [Zn_T] mesurées en fonction des [Zn_T] connues entre 0 et 0,3 mM de zinc. 25 solutions de concentrations croissantes en zinc ont été préparées (incrément de 0,002 mM entre 0 et 0,02 mM de zinc et incréments de 0,02 mM entre 0,02 mM et 0,3 mM de zinc) et mesurées afin de déterminer la précision avec laquelle le protocole permettrait de mesurer le zinc en substitution du calcium dans les échantillons. La droite (orange) représente la droite unité. Cette expérience souligne que le protocole actuel mesure le zinc de manière précise, toutefois, le divalent est interchangeable avec le calcium vu que l'allure des figures 5 (calibration pour le calcium - #3) et 6 (calibration pour le zinc - #4) est identique. Le protocole permet de mesurer de manière précise les [Zn_T] connues et ce jusqu'à 0,2 mM de zinc, concentration à laquelle tous les sites de liaison du BAPTA sont saturés par le zinc.

Il est important de remarquer que le zinc a un comportement très similaire au calcium en termes de liaison au BAPTA, comme le souligne le caractère presque identique des deux tracés. L'affirmation de Qian et Colvin, 2015 est donc vérifiée puisque la liaison du Ca²⁺ par BAPTA n'est pas sélective. Aussi, il est possible de déduire du Tableau 1 et des calibrations #3 et #4 que lorsqu'il est incorporé dans l'aliquote, l'EGTA capturera tout le

Ca^{2+} et le Zn^{2+} initialement lié au BAPTA. Le changement d'absorbance $A_0 - A_M$ occasionné est donc associé à une combinaison des deux divalents en proportions non déterminées par la méthode de mesure utilisée. Cependant, dans le cas spécifique des calibrations #3 et #4, les divalents n'étaient pas simultanément présents dans les échantillons de solution, évitant ainsi toute compétition possible au niveau des sites de liaison du BAPTA et de l'EGTA. Lors de l'analyse des tissus biologiques, cette rivalité existera et il sera important de pouvoir la contrôler.

En résumé, l'ensemble des éléments décrits jusqu'à présent consistait à adapter la méthode BAPTA de Lamboley *et al.*, 2015 au lecteur de plaques. Cet objectif a été atteint tel qu'indiqué par les Figures 5 et 6.

Il a également été possible de calculer les coefficients d'extinction relatifs à la liaison BAPTA- Ca^{2+} ($\Delta\epsilon_{Ca} \equiv \epsilon_{CaB} - \epsilon_B$) et BAPTA- Zn^{2+} ($\Delta\epsilon_{Zn} \equiv \epsilon_{ZnB} - \epsilon_B$), résumés dans le tableau suivant.

Tableau 3 : Valeurs des coefficients d'extinction calculés ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

	Appareil de mesure	$\Delta\epsilon_{Ca} (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	$\Delta\epsilon_{Zn} (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$
Valeur calculée	Lecteur de plaques	- 4292,77	- 3798,55
Lamboley <i>et al.</i>, 2015	Spectrophotomètre	- 4689,37	-
Qian et Colvin, 2015	Spectrophotomètre	- 4630,00	- 3980,00

Les valeurs de $\Delta\epsilon$ du Tableau 1 sont négatives car le coefficient d'extinction du BAPTA libre (ϵ_B) est plus élevé que celui du BAPTA lié (ϵ_{CaB} pour la liaison au Ca^{2+} ou ϵ_{ZnB} pour la liaison au Zn^{2+}).

Globalement, les résultats obtenus dans la présente étude sont en accord avec ceux de Lamboley *et al.*, 2015 et Qian et Colvin, 2015.

Les sections subséquentes porteront sur la mise en place des stratégies permettant de mesurer le calcium et le zinc de manière individuelle indépendamment de leur présence simultanée dans l'échantillon de tissu, notamment grâce à l'introduction du TPEN.

Introduction du TPEN

Le choix du chélateur TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylméthyl)éthylènediamine) s'est effectué essentiellement en raison du fait que son affinité pour le Zn^{2+} reste beaucoup plus élevée que celle pour le Ca^{2+} (se référer au Tableau 1). En présence de concentrations physiologiques des deux divalents, le TPEN sera capable de capturer le Zn^{2+} de manière préférentielle, évitant ainsi que la mesure du Ca^{2+} ne soit influencée par la présence de Zn^{2+} . De plus, Qian et Colvin (2015) ont proposé l'utilisation du TPEN dans leur essai d'adaptation de la méthode BAPTA de Lamboley *et al.*, 2015 avec pour l'objectif d'inclure la mesure du Zn^{2+} . Cependant, la concentration de TPEN utilisée dans Qian et Colvin, 2015 (0,2 mM) est différente de celle que nous avons jugé adéquate dans le cadre de notre projet (0,05 mM) (plus d'éléments seront donnés relativement à la justification de cette approche). Le TPEN est hautement soluble dans les solvants organiques et modérément soluble en solution aqueuse (Colvin *et al.*, 2008), il a donc été dissous dans 100 % d'éthanol dans la présente étude.

Certaines considérations importantes sont à prendre en compte lors de l'introduction d'un nouveau chélateur dans une méthode qui en comporte déjà 2, notamment:

- Évaluer si le TPEN présente une absorbance dans les longueurs d'onde d'intérêt (250 - 340 nm, la mesure principale se faisant à 292 nm)
- Déterminer la concentration optimale de TPEN ([TPEN]) à utiliser
- Analyser les interactions possibles entre les différents chélateurs utilisés

Spectre d'absorbance du TPEN

Afin de déterminer si le TPEN absorbe dans les longueurs d'ondes d'intérêt de la présente étude (250 - 340 nm), une expérience sans BAPTA a été réalisée. En effet, 0,2 mM de TPEN (concentration utilisée par Qian et Colvin, 2015) a été introduit dans la solution de mesure (MS) et l'analyse a été effectuée en absence de tissu biologique (procédé similaire aux sections C et D de la Figure 1).

La Figure 7 représente l'absorbance du TPEN mesurée en fonction de la longueur d'onde. Il est possible de noter que le TPEN présente une absorbance non négligeable entre 250 et 280 nm, pouvant directement influencer sur les valeurs de calcium ou de zinc mesurées dans le cadre du protocole développé (de même, l'absorbance intrinsèque du TPEN n'est pas nulle

à 292 nm). En effet, la méthode est essentiellement basée sur l'occurrence de changements d'absorbance lors de l'ajout de différentes solutions, impliquant qu'il ne devrait y avoir aucun autre composant qui absorbe à l'exception du BAPTA.

Les spectres d'absorbances dénotés A_M , A_0 et A_S (points noirs, bleus et violets; respectivement) sont superposés, indiquant notamment que le TPEN n'interagit pas avec l'EGTA. Lors de l'ajout de Ca^{2+} en excès (A_∞), un léger décalage du spectre de A_∞ (points verts) est noté entre 250 et 280 nm (sous forme de perte d'absorbance) comparativement aux autres spectres (A_M , A_0 et A_S); correspondant à la liaison probable du TPEN au Ca^{2+} .

L'absorbance intrinsèque du TPEN est négligeable après 300 nm.

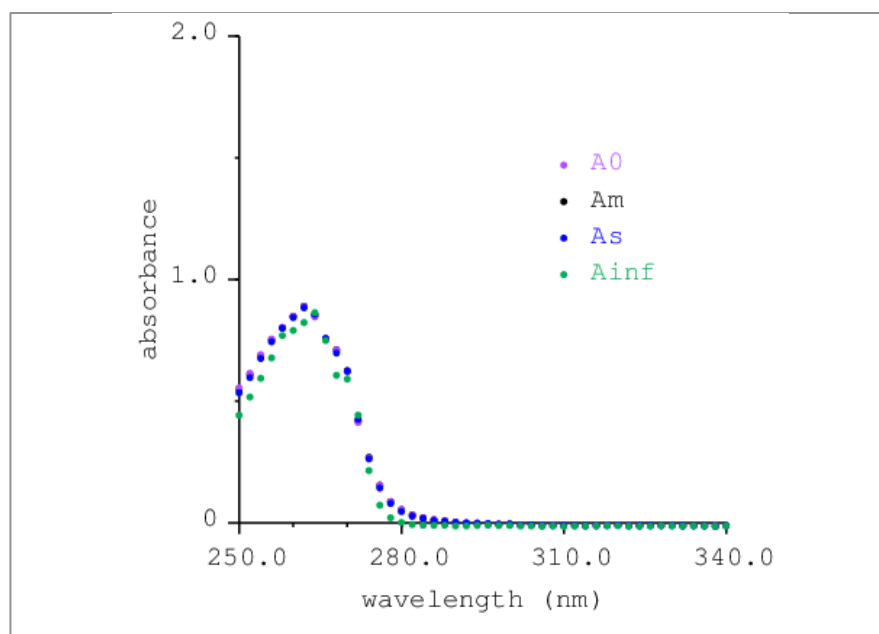


Figure 7 : Spectre d'absorbance de 0,2 mM de TPEN

Figure 7 : Représentation du spectre d'absorbance du TPEN entre 250 et 340 nm. Le BAPTA (0,2 mM) a été substitué à 0,2 mM de TPEN dans la solution de mesure afin de pouvoir exclusivement enregistrer le signal relatif au TPEN. Entre 250 et 280 nm, le TPEN absorbe de manière importante comparativement aux longueurs d'ondes supérieures à 300 nm où le signal est négligeable. Les spectres d'absorbance nommés A_M , A_0 , A_S et A_∞ ont été obtenus suivant le même protocole défini à la Figure 1.

Concentration de TPEN optimale

Même si Qian et Colvin, 2015 ont jugé l'utilisation de 0,2 mM de TPEN acceptable, nous avons souhaité, dans le cadre de la présente étude, déterminer quelle serait la [TPEN] nécessaire pour lier de manière sélective des niveaux physiologiques de Zn^{2+} (tel que mentionné dans les prochains paragraphes, la $[\text{Zn}_T]$ que nous avons estimée dans les muscles squelettiques est de 4,5 μM ; concernant le cerveau, se référer à la sous-section « Implications physiologiques du zinc » de l'Introduction), l'objectif étant de minimiser autant que possible l'absorbance intrinsèque du TPEN tout en conservant des propriétés de chélation optimales. Pour ce faire, 25 solutions de concentrations croissantes en zinc (de 0 à 0,3 mM) ont été préparées (se référer à la calibration #4, Figure 6) et mesurées en présence de 50 μM de TPEN (Figure 8).

La figure 8 représente les $[\text{Zn}_T]$ mesurées (orange) en fonction des $[\text{Zn}_T]$ connues (préparées) et ceci en présence de 50 μM de TPEN. De 0 à 14 μM de $[\text{Zn}_T]$ connues, les $[\text{Zn}_T]$ mesurées sont nulles car le TPEN a été capable d'en capturer la totalité. En d'autres termes, le BAPTA n'a lié aucun Zn^{2+} dans cet intervalle, expliquant le caractère négligeable du signal obtenu. A partir de 14 μM de zinc, un signal traduisant la saturation des sites de liaison du TPEN par le Zn^{2+} commence à apparaître. Concrètement, le TPEN n'est plus en mesure de lier tout le Zn^{2+} présent dans l'échantillon et le Zn^{2+} commence alors à occuper les sites de liaison disponibles au niveau du BAPTA, générant ainsi le signal détecté pour des $[\text{Zn}_T]$ connues supérieures à 14 μM .

En résumé, la Figure 8 démontre qu'il sera possible d'empêcher le Zn^{2+} , à des $[\text{Zn}_T]$ inférieures à 14 μM , de se lier au BAPTA; annulant ainsi le phénomène de compétition qui existait avec le Ca^{2+} . Sachant que les valeurs physiologiques de $[\text{Zn}_T]$ estimées sont de l'ordre de 4,5 μM (environ 15 % de la valeur de $[\text{Ca}_T]$ dans le muscle squelettique), cette expérience prouve que la [TPEN] de 50 μM est suffisante pour capturer une quantité de zinc 3 fois plus importante que celle estimée (cette marge de manœuvre permet d'anticiper sur des valeurs de $[\text{Zn}_T]$ potentiellement plus élevées dans le cerveau).

De plus, la [TPEN] utilisée dans la présente étude est 4 fois moins importante que celle proposée par Qian et Colvin, 2015 tout en permettant une chélation optimale dans l'intervalle d'intérêt des $[\text{Zn}_T]$. L'absorbance intrinsèque du TPEN a également été réduite.

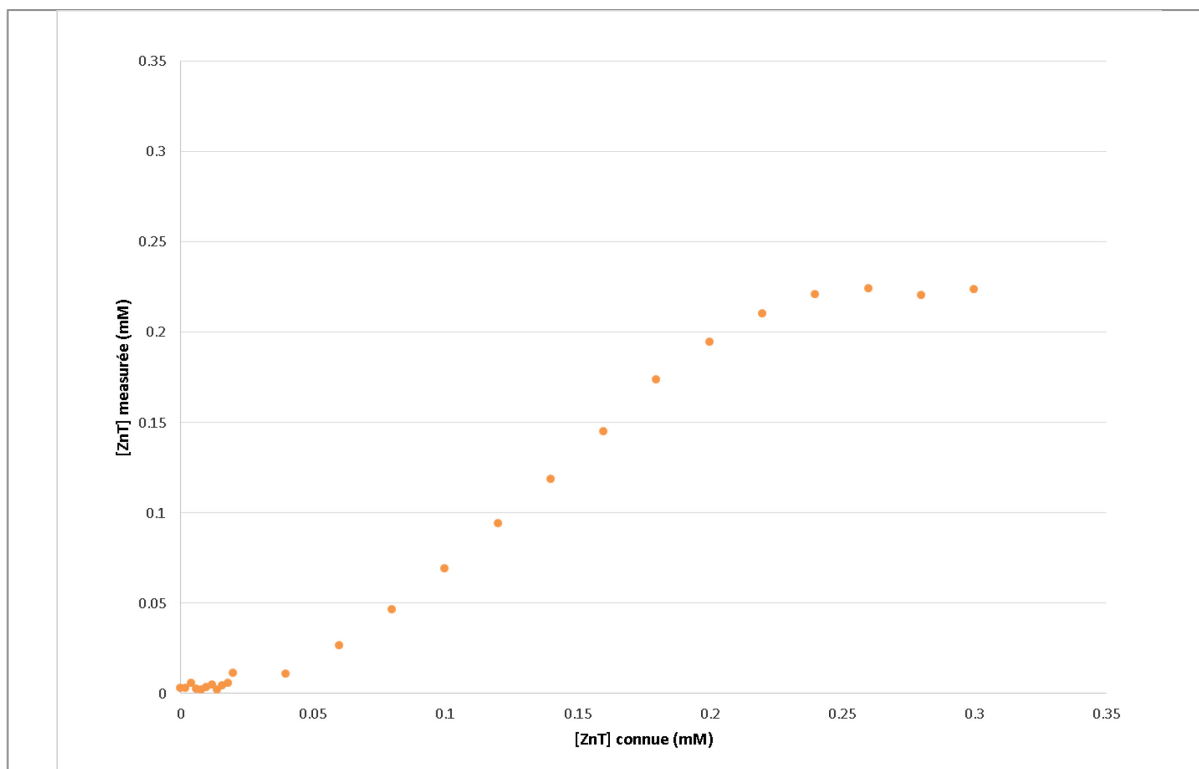


Figure 8 : [Zn_T] mesurées avec 50 μ M de TPEN

Figure 8 : Représentation des [Zn_T] mesurées (orange) en fonction des [Zn_T] connues en présence de 50 μ M de TPEN. Le TPEN est capable de capturer la totalité des ions Zn²⁺ présents dans l'échantillon pour les [Zn_T] connues situées entre 0 et 14 μ M car les [Zn_T] mesurées sont nulles dans cet intervalle. Le BAPTA est essentiellement libre entre 0 et 14 μ M de [Zn_T] connues (pas de Zn²⁺ lié), expliquant le caractère négligeable du signal obtenu. A partir de 14 μ M de zinc, un signal traduisant la saturation des sites de liaison du TPEN par le Zn²⁺ commence à apparaître. Le TPEN n'est plus en mesure de lier tout le Zn²⁺ présent dans l'échantillon et le Zn²⁺ commence alors à occuper les sites de liaison disponibles au niveau du BAPTA, générant ainsi le signal détecté pour des [Zn_T] connues supérieures à 14 μ M.

Par la suite, la nouvelle [TPEN] sera incorporée au protocole et une expérience de calibration supplémentaire réalisée, cette fois ci en présence simultanée des deux divalents.

Modification du protocole et calibration #5

La Figure 9 est un résumé des modifications apportées au protocole après introduction du TPEN.

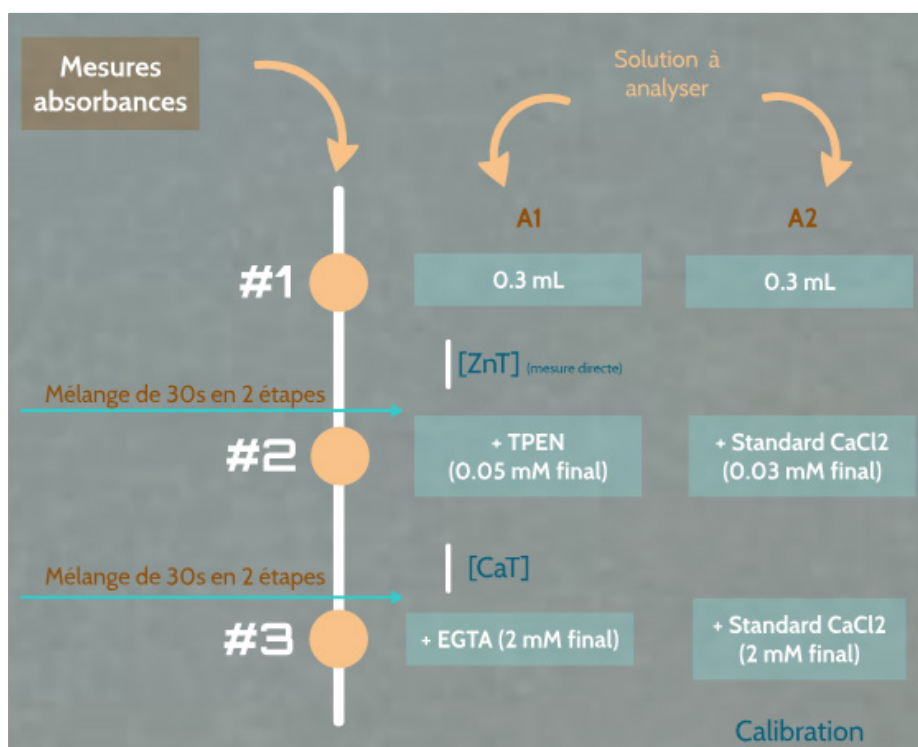


Figure 9 : Protocole de mesure après introduction du TPEN

Figure 9 : Présentation du protocole de mesure incluant les modifications relatives au TPEN. 0,3 mL de la solution à mesurer est individuellement incorporée dans 2 puits de la plaque (A1 et A2). Une 1^{ère} mesure d'absorbance est réalisée pour chacun des 2 puits (A_M , étape #1). Par la suite, 12 μL d'une solution de 1,25 mM de TPEN ($[\text{TPEN}]$ finale = 50 μM) sont ajoutés à A1 et une concentration finale de 0,03 mM de CaCl_2 incorporée à A2, donnant les mesures d'absorbance A_{Z0} et A_S , respectivement (étape #2). Enfin, des solutions d'EGTA et de Ca^{2+} en excès sont rajoutés aux puits A1 et A2, respectivement, aboutissant aux mesures d'absorbance A_0 et A_∞ (étape #3).

La différence $A_{Z0} - A_M$, traduisant le changement d'absorbance occasionné lorsque le Zn^{2+} initialement lié au BAPTA est capturé par le TPEN, permet de déterminer la $[\text{Zn}_T]$. Quant à la $[\text{Ca}_T]$, elle est calculée à partir de la différence $A_0 - A_{Z0}$ quand tout le Ca^{2+} initialement lié au BAPTA est capturé par l'EGTA. Vu que les aliquotes A_0 et A_{Z0} contiennent chacun 50

μM de TPEN, il est raisonnable de considérer que l'absorbance intrinsèque du TPEN sera soustraite grâce à cette différence.

La différence majeure entre le protocole représenté à la Figure 9 et celui de Lamboley *et al.*, 2015 demeure dans le fait que le TPEN est incorporé avant l'ajout de l'EGTA. De même, le protocole de mélange de l'échantillon se fait en 2 étapes (Figure 4).

Afin de tester la fiabilité de la méthode développée, la calibration #5 (Figure 10) a été réalisée en analysant des solutions de concentrations connues en calcium et en zinc, les deux divalents étant présents simultanément dans les échantillons (Figure 10). La calibration #5 consistait en l'analyse de 25 solutions de $[\text{Ca}_T]$ croissantes (de 0 à 0,3 mM) dans lesquelles une $[\text{Zn}_T]$ fixe de 5 μM a été incorporée dans chaque échantillon.

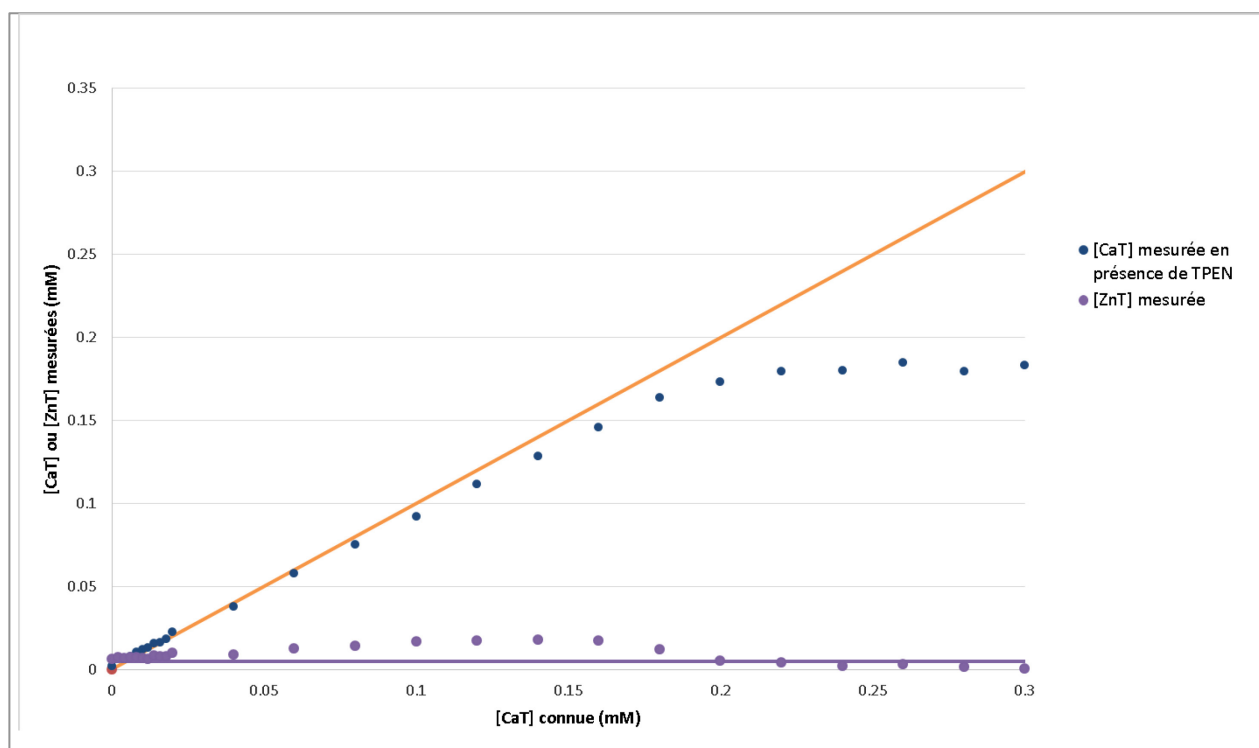


Figure 10 : Calibration #5, mesures simultanées de $[\text{Ca}_T]$ et de $[\text{Zn}_T]$

Figure 10 : Illustration des mesures obtenues en préparant des solutions de concentrations en calcium et en zinc connues, les deux divalents étant présents simultanément dans les échantillons. 25 solutions de $[\text{Ca}_T]$ croissantes (de 0 à 0,3 mM), dans lesquelles une $[\text{Zn}_T]$ fixe de 5 μM a été incorporée dans chaque échantillon, ont été préparées et mesurées. En ordonnée, les $[\text{Ca}_T]$ (points bleus) ou $[\text{Zn}_T]$ (points violets) connues ont été mesurées et tracées en fonction des $[\text{Ca}_T]$ connues. La droite violette ($y = 5 \mu\text{M}$) représente la trajectoire

que les valeurs de $[Zn_T]$ connues devraient suivre advenant que la méthode soit fiable. Une déviation majeure des valeurs de $[Zn_T]$ de cette droite a été identifiée (concernant spécifiquement les solutions contenant entre 0,04 et 0,2 mM de $[Ca_T]$), impliquant ainsi un désaccord entre les valeurs de concentrations connues et celles qui sont mesurées. La fiabilité de la mesure du zinc n'est donc pas optimale.

Par contre, les $[Ca_T]$ mesurées restent fiables jusqu'à 0,08 mM avant qu'une déviation des points par rapport à la droite unité (orange) n'apparaisse, ce qui n'était pas le cas en absence de TPEN (se référer à la Figure 5 pour comparer les résultats avec la trajectoire attendue).

Le TPEN semble être la cause du manque de précision de la méthode obtenu avec la calibration #5 (Figure 10). Plusieurs hypothèses ont été examinées afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à ces résultats :

- Liaison du TPEN au Ca^{2+} : des modélisations mathématiques ont permis de déterminer que presque 100% du Ca^{2+} reste lié au BAPTA après l'ajout du TPEN.
- Le Zn^{2+} interfère avec la mesure du Ca^{2+} : des expériences de calibration subséquentes ont montré que tel n'était pas le cas (Figure 12, calibrations #6A et #6B).
- Le TPEN interagit avec le BAPTA : en étudiant les spectres d'absorbance de solutions contenant 0 Ca^{2+} et 0 Zn^{2+} , il a été possible de remarquer que l'ajout du TPEN seul occasionnait un changement du spectre d'absorbance du BAPTA. En effet, ces observations prouvent que le TPEN a la possibilité d'interagir avec le BAPTA selon des mécanismes qui sont encore à l'étude dans notre laboratoire et qui expliqueraient très probablement les résultats obtenus à la Figure 10. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'articles ayant étudié cette interaction BAPTA/TPEN.

Adaptation du protocole et calibration #6

La stratégie mise en place après cette découverte fût d'utiliser un puits supplémentaire par échantillon mesuré, avec un total de 3 puits par échantillon analysé (Figure 11). En procédant de la sorte, les valeurs des concentrations d'intérêt peuvent être obtenues à partir de puits différents, évitant ainsi de baser tous les calculs sur le puits dans lequel le TPEN perturbe les mesures.

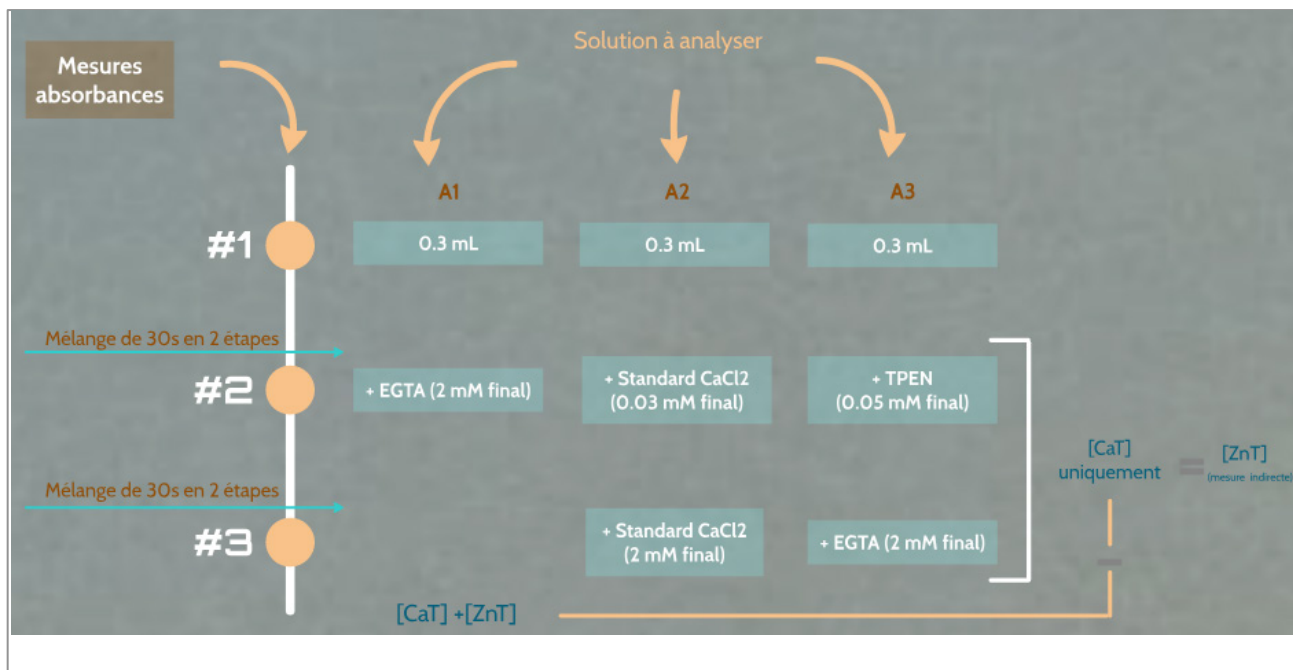


Figure 11 : Adaptation du protocole avec 3 puits par échantillon

Figure 11 : Modification du protocole suite aux résultats obtenus lors de la calibration #5 (Figure 10). Comparativement à la Figure 9, l'ajout du TPEN est limité au puits #3 (A3) et n'influe donc pas sur la mesure obtenue dans A1. La somme des concentrations ($[Ca_T] + [Zn_T]$) est déterminée à partir de A1 d'une manière similaire au protocole de Lamboley *et al.*, 2015. Par la suite, la différence $A_0 - A_{Z0}$ dans A3 permet d'obtenir la $[Ca_T]$. Enfin, il est possible de calculer la $[Zn_T]$ (par mesure indirecte) en effectuant la différence entre les valeurs de ($[Ca_T] + [Zn_T]$) (A1) et $[Ca_T]$ (A3).

Afin de tester cette adaptation du protocole, une série de calibrations a été effectuée. En effet, il s'agit de la réalisation de 4 sous-expériences distinctes dans lesquelles les solutions préparées contiennent des concentrations variables en calcium et en zinc (et non juste une $[Zn_T]$ fixe comme pour la calibration #5). Le Tableau 4 résume la composition des solutions analysées dans le cadre de la calibration #6.

Tableau 4 : Calibration #6 - Composition des solutions

		Solutions préparées				
		1	2	3	4	5
# 6A	[Ca _T] mM	0	0,01	0,02	0,03	0,04
	[Zn _T] mM	0	0	0	0	0
# 6B	[Ca _T] mM	0	0,01	0,02	0,03	0,04
	[Zn _T] mM	0,0045	0,0045	0,0045	0,0045	0,0045
# 6C	[Ca _T] mM	0	0	0	0	0
	[Zn _T] mM	0	0,0025	0,005	0,0075	0,01
# 6D	[Ca _T] mM	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
	[Zn _T] mM	0	0,0025	0,005	0,0075	0,01

Chaque sous-calibration (#6A à #6D) est composée de 5 solutions distinctes préparées en variant les proportions en calcium et en zinc, comme représenté au Tableau 4. Les sous-calibrations #6A et #6C permettent de mesurer les [Ca_T] et [Zn_T], respectivement, lorsqu'un seul type de divalent est présent à la fois dans l'échantillon. Par contre, #6B et #6D renseignent sur la précision de la mesure de la concentration en un divalent donné lorsque l'autre divalent est simultanément présent dans la même solution et en concentrations variables. L'objectif est de complexifier d'avantage les calibrations afin de tester les limites de la méthode.

La Figure 12 est basée sur les calibrations #6A et #6B du Tableau 4. Des concentrations croissantes de 0 à 0,04 mM de calcium sont analysées, soit de manière isolée (calibration #6A) ou en présence de 0,0045 mM de zinc dans tous les échantillons de calcium (calibration #6B). La Figure 12 illustre la précision avec laquelle le protocole décrit à la Figure 11 permet de mesurer du calcium en présence ou en absence de zinc, laissant conclure que la [Ca_T] déterminée est fiable indépendamment de la présence du zinc.

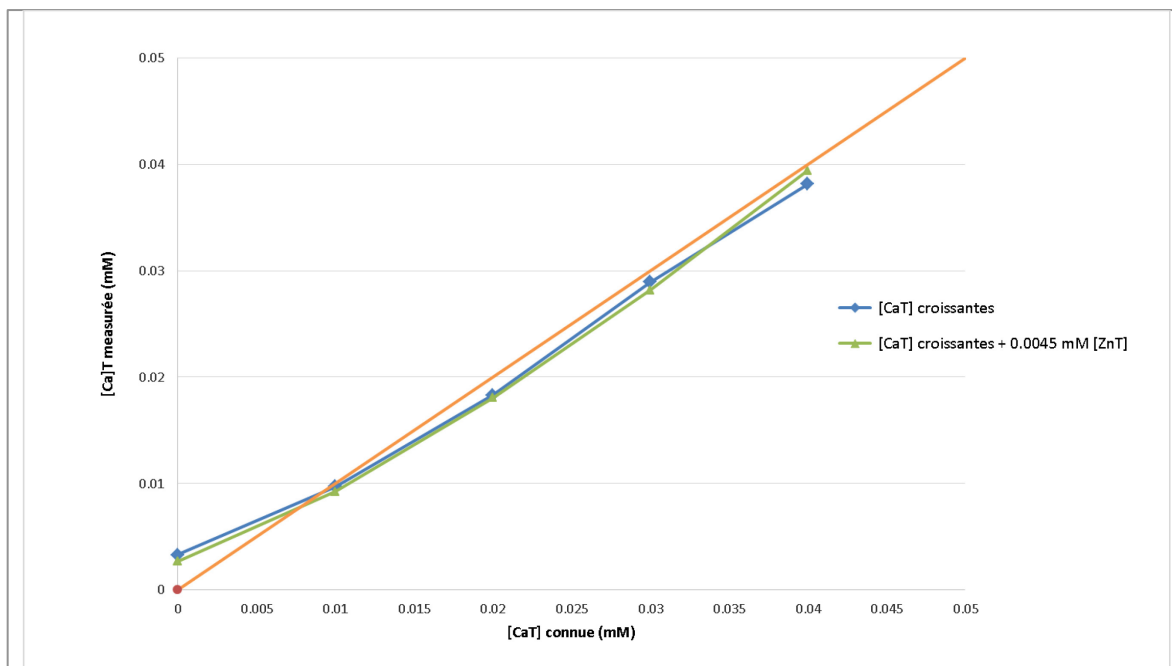


Figure 12 : Calibrations #6A et #6B, analyse d'échantillons lorsque le calcium est présent seul et simultanément avec du zinc

Figure 12 : Illustration des résultats obtenus en représentant les valeurs de concentrations mesurées selon que le calcium soit présent seul ou simultanément avec le zinc dans les échantillons de calibration. Associée aux calibrations #6A et #6B du Tableau 4, la Figure 12 permet de visualiser les $[Ca_T]$ mesurées en fonction des $[Ca_T]$ connues et ceci en absence (tracé bleu) ou en présence de $4,5 \mu M$ de zinc (tracé vert). Le fait que ces deux tracés soient presque parfaitement superposés démontre que le Zn^{2+} n'interfère pas avec la mesure du calcium (ceci est un élément justificatif concernant les explications relatives à la calibration #5, Figure 10).

Ces résultats représentent une avancée majeure par rapport à la problématique de départ de la présente étude, portant notamment sur la compétition qui existait entre le Ca^{2+} et le Zn^{2+} relativement aux sites de liaison du BAPTA.

La Figure 13 est basée sur les calibrations #6C et #6D du Tableau 4. Des concentrations croissantes de 0 à 0,01 mM de zinc sont analysées, soit de manière isolée (calibration #6C) ou en présence de 0,03 mM de calcium dans tous les échantillons de zinc (calibration #6D). Lorsque le calcium est absent des échantillons (calibration #6C), les $[Zn_T]$ mesurées correspondent aux $[Zn_T]$ connues. Par contre, dès que 0,03 mM de calcium est rajouté aux

échantillons de zinc, un décalage des $[Zn_T]$ mesurées se manifeste par rapport aux $[Zn_T]$ connues. En effet, cet écart semble rester constant indépendamment de la $[Zn_T]$ connue. L'origine exacte du décalage n'a pas encore été identifiée mais des évidences suggèrent que cela puisse être lié aux effets du TPEN (de par son absorbance qui pourrait ne pas être totalement éliminée lors des analyses ou encore à travers l'interaction probable du TPEN, d'une manière non encore identifiée, avec le BAPTA; se référer au commentaire de la Figure 10, calibration 5). La correction apportée à ce décalage consiste à déterminer la valeur de $[Zn_T]$ mesurée pour une $[Zn_T]$ connue de 0 mM et de la soustraire de toutes les autres $[Zn_T]$ mesurées, permettant ainsi d'obtenir des valeurs de $[Zn_T]$ mesurées équivalentes à celles connues (Figure 13, tracé jaune). Par ailleurs, la Figure 13 confirme le caractère adéquat de la [TPEN] utilisée considérant que la $[Zn_T]$ maximale mesurée ici est de 10 μM , comparativement à la valeur estimée de $[Zn_T]$ en conditions physiologiques qui serait d'environ 4,5 μM dans le muscle squelettique.

En outre, la Figure 13 permet d'apprécier la sensibilité de la méthode développée s'agissant spécifiquement de la mesure de très faibles concentrations en zinc (par exemple : 2,5 μM).

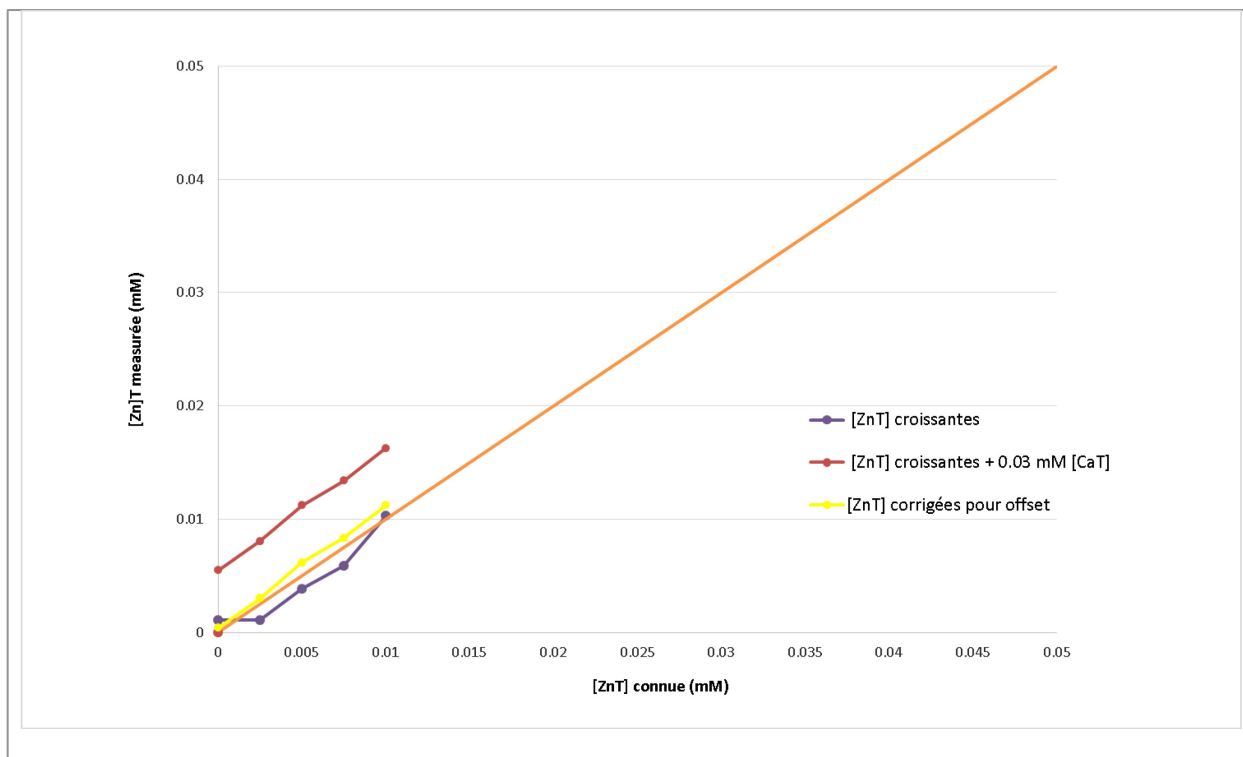


Figure 13 : Calibrations #6C et #6D, analyses d'échantillons lorsque le zinc est présent seul et simultanément avec du calcium

Figure 13 : Illustration des résultats obtenus en représentant les valeurs de concentrations mesurées selon que le zinc soit présent seul ou simultanément avec le calcium dans les échantillons de calibration. Associée aux calibrations #6C et #6D du Tableau 4, la figure 13 représente les $[Zn_T]$ mesurées en fonction des $[Zn_T]$ connues et ceci en absence (tracé violet) ou en présence de 0,03 mM de calcium (tracé rouge). Les mesures semblent fiables uniquement lorsque le zinc est présent seul dans l'échantillon. Lorsque 0,03 mM de calcium sont rajoutés dans chaque solution contenant du zinc, un décalage semble se dessiner avec une pente constante (pour toutes les solutions de calibration) et similaire à celle de la droite unité (tracé rouge); indiquant notamment que le Ca^{2+} interfère avec la mesure de $[Zn_T]$ vu que la mesure n'est perturbée qu'en présence de Ca^{2+} . Une correction des valeurs de $[Zn_T]$ mesurées peut être réalisée (tracé jaune) basée sur la soustraction de la valeur de l'écart constaté (se référer au texte pour plus de détails). Les points associés au tracé obtenu après correction suivent la trajectoire de la droite unité (orange), permettant ainsi de conclure que les $[Zn_T]$ sont déterminées de manière fiable en présence de Ca^{2+} .

uniquement en appliquant une correction comme précédemment indiqué (soustraction de la valeur de l'écart).

La calibration #6 constitue un tournant remarquable dans le développement de la nouvelle méthode car il est à présent possible de mesurer précisément les concentrations des deux divalents présents seuls et/ou simultanément dans le même échantillon.

Calibration spécifique des échantillons de tissus biologiques

Prenant en compte l'écart déterminé lors de la mesure du zinc en présence de Ca^{2+} , il a été proposé d'effectuer une calibration spécifique à chaque plaque d'échantillons biologiques analysés. En effet, l'objectif est de calibrer chaque plaque d'échantillons avec les solutions de calibrations simultanément analysées et ceci afin de garantir une plus grande précision des résultats. Concrètement, la même plaque de mesure contient à la fois une série de puits associés aux tissus biologiques d'intérêt tandis qu'un nombre déterminé de puits supplémentaires contient des solutions de calibration de composition en calcium et/ ou en zinc connue. Les concentrations mesurées dans les échantillons de calibration permettent de corriger les valeurs déterminées au sein des tissus biologiques.

Les 4 solutions de calibration (voir tableau) étaient régulièrement préparées à partir de la même solution de mesure (MS) servant à homogénéiser les tissus étudiés (notamment afin d'avoir la même proportion de calcium dans le bruit de fond) et selon la composition suivante :

	1	2	3	4
[Ca _T] mM	0,03	0,03	0,03	0,03
[Zn _T] mM	0	0,003	0,006	0,009

Après avoir analysé ces échantillons de calibration, un tracé représentant spécifiquement les [Zn_T] mesurées en fonction des [Zn_T] connues peut être obtenu (Figure 14). Cette approche permet de déterminer l'équation d'une droite pouvant ensuite être utilisée pour corriger les valeurs de [Zn_T] mesurées relatives aux échantillons de tissus biologiques.

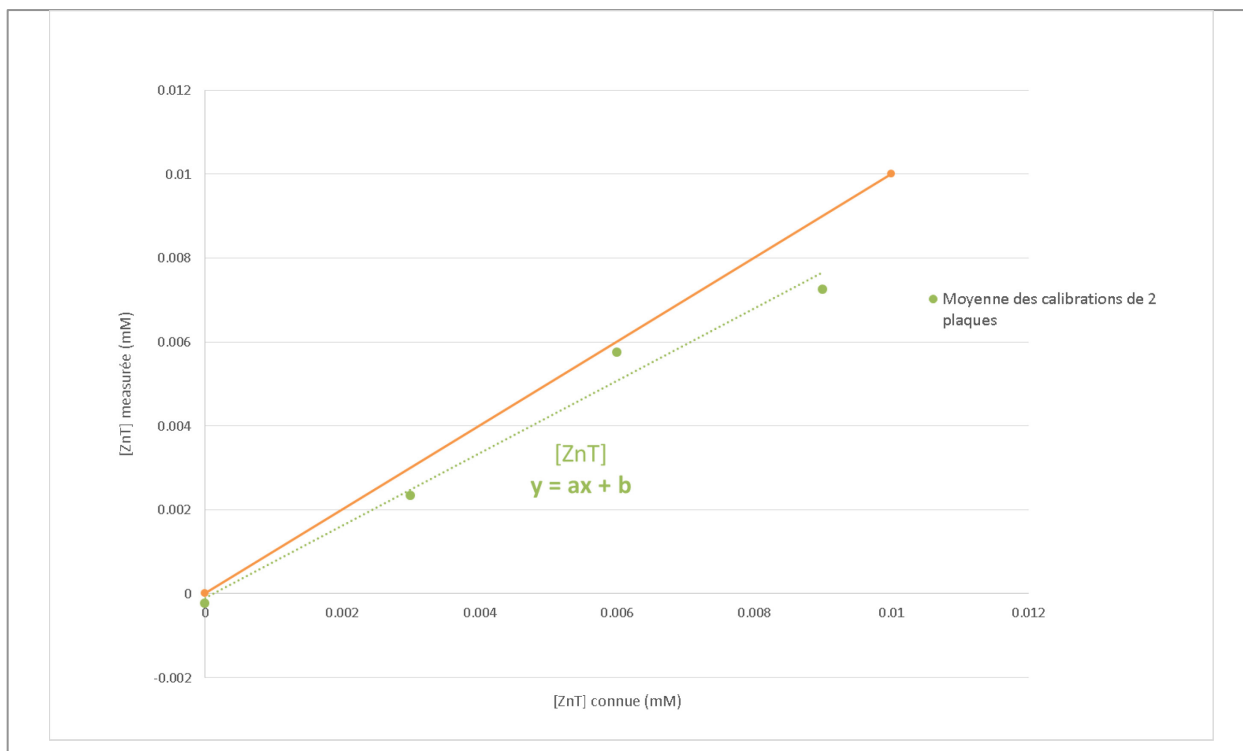


Figure 14 : Calibration spécifique au zinc pour chaque plaque analysée

Figure 14 : Représentation d'une moyenne des $[Zn_T]$ mesurées (points verts) en fonction des $[Zn_T]$ connues en présence de 0,03 mM de calcium et ceci pour 2 plaques contenant également des échantillons de tissus biologiques. Même si la méthode reste sensible aux faibles variations en zinc, une certaine déviation des données (ligne en pointillés verts) est observable, comparativement à la droite unité (orange). La solution mise en place est de déterminer l'équation de la droite que dessinent les données de $[Zn_T]$ mesurées (de type $y = ax + b$) et d'appliquer cette équation pour corriger les valeurs de $[Zn_T]$ provenant des tissus biologiques.

En résumé, les différentes étapes ayant permis le développement de la nouvelle méthode de mesure de $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ lorsque les deux divalents sont présents simultanément dans l'échantillon ont été décrites. Dans les prochaines sections, une attention particulière sera portée à la description résumée du nouveau protocole de mesure et à l'application pouvant en être faite afin d'analyser des échantillons de tissus biologiques.

Application aux tissus biologiques

Modèle animal et tissus biologiques étudiés

Un total de 23 souris femelles C57BL/6 a été utilisé dans la présente étude. Une subdivision en 3 sous-groupes a été effectuée essentiellement en fonction de l'âge et de la nature des tissus étudiés:

- Groupe I : 12 souris âgées de 4 à 6 mois représentent le groupe contrôle, s'agissant de l'analyse des 5 régions du cerveau concernées : les bulbes olfactifs, le cortex cérébral, le striatum, l'hippocampe et le cervelet (se référer à la section « Application au cerveau » de l'Introduction). Le poids moyen des souris appartenant à ce groupe est de 26,55 g (0,60) et celui des cerveaux est de 0,450 g (0,005). Les chiffres entre parenthèses représentent les S.E.M.
- Groupe II : 5 souris âgées de 7 à 11 mois (groupe de souris les plus âgées), l'étude a porté sur les mêmes régions du cerveau comparativement au Groupe I (exception étant faite du cervelet). Le poids moyen des souris appartenant à ce groupe est de 33,16 g (1,77) et celui des cerveaux est de 0,448 g (0,009).
- Groupe III : 6 souris âgées de 2 mois ayant permis l'analyse des muscles squelettiques de type EDL et soleus.

Tableau 5 : Poids des tissus analysés (g) (S.D., S.E.M.)

Type de tissu	Groupe I		Groupe II		Groupe III	
	N	Poids tissu (g)	N	Poids tissu (g)	N	Poids tissu (g)
Bulbes olfactifs	24	0,0096 (0,0024; 0,0005)	10	0,0121 (0,0013; 0,0004)		
Cervelet	12	0,0601 (0,0024; 0,0007)		-		
Hippocampe	24	0,0112 (0,0024; 0,0005)	10	0,0104 (0,0025; 0,0008)		
Striatum	24	0,0112 (0,0024; 0,0005)	10	0,0077 (0,0032; 0,0010)		
Cortex	12	0,1550 (0,0173; 0,0050)	5	0,1500 (0,0110; 0,0050)		
EDL					12	0,0076 (0,0014; 0,0004)
Soleus					12	0,0056 (0,0007; 0,0002)

Le tableau 5 représente l'ensemble des statistiques liées aux tissus biologiques analysés dans la présente étude. En raison d'un problème technique, les données des cervelets du Groupe II n'ont pas été exploitables. N représente le nombre d'échantillons analysés.

Description du protocole

Préparation des échantillons

Les muscles squelettiques furent extraits suivant l'approche de Lamboley *et al.*, 2015. S'agissant du cerveau, une microdissection permettant l'extraction des régions d'intérêt a été effectuée. Les échantillons ont ensuite été placés dans des tubes centrifuges individuels et congelés (à - 21° C) pour analyse ultérieure.

Pour procéder à l'homogénéisation, des billes de téflon (8 par échantillon) sont introduites dans des tubes centrifuges (fournis par OPS diagnostic; Lebannon, New Jersey USA) avant

l'incorporation du tissu. Ensuite, 200 μ L de la solution de mesure (MS) sont ajoutés dans le tube (Figure 15, plus d'éléments concernant la composition de la solution sont décrits à la section « Développement de la nouvelle méthode » - calibration #1) et un broyage mécanique des échantillons est réalisé grâce à un appareil exerçant un mouvement mécanique de va-et-vient des tubes centrifuges (HT mini model D1030 de OPS diagnostic; Lebannon, New Jersey USA), permettant ainsi aux billes de téflon de déchiqueter le tissu jusqu'à homogénéisation complète. Nous utilisons régulièrement du matériel de laboratoire en téflon en raison de la faible libération de Ca^{2+} intrinsèque occasionnée par ce matériau, minimisant ainsi les flux de Ca^{2+} non contrôlés lors de nos expériences. Il a été prouvé que le verre (par exemple, le matériel de type pyrex) représente un matériau libérant du Ca^{2+} de manière non négligeable (se référer à la Figure S4 de Lamboley *et al.*, 2015 pour plus de renseignements). Aussi, nous ne recommandons pas l'utilisation de billes d'homogénéisation en acier inoxydable car celles-ci présentent un effet de corrosion avancé au bout de quelques utilisations (testées par notre laboratoire).

Les muscles squelettiques sont homogénéisés pendant 3 à 8 min alors que les échantillons de cerveau le sont pendant 2 mn. Par la suite, la MS est rajoutée afin d'obtenir un volume final de 1,7 mL et 0,5 % de SDS est incorporé (ajouté à la fin afin d'éviter la formation excessive de mousse). Vu que les échantillons de cortex et de cervelet sont plus volumineux que les autres, un facteur de dilution de 10 et de 5, respectivement, a été appliqué lors de la préparation de ceux-ci (proportionnel au poids de l'échantillon). Un ratio de 1,7 mL de solution pour 10 mg de tissu (poids humide) est généralement jugé adéquat (Lamboley *et al.*, 2015 proposent un ratio de 1,2 mL de solution pour 10 mg de tissu mais vu qu'un puits supplémentaire a été rajouté pour chaque échantillon nous avons adapté ce chiffre à 1,7 mL afin de disposer d'une quantité suffisante de surnageant pour pouvoir réaliser nos analyses). Ensuite, les tubes centrifuges sont pesés afin de déterminer le volume exact de solution rajouté par différence de poids (les tubes contenant uniquement les billes de téflon étaient également pesés avant le début de l'expérience). Les échantillons sont finalement centrifugés et le surnageant récupéré (Figure 15). Après chaque utilisation, les billes de téflon sont rincées avec la solution de mesure puis avec de l'eau purifiée (eau dont la résistance se situe aux alentours de 18 M Ω , permettant ainsi de garantir un faible contenu en minéraux afin de ne pas interférer avec nos analyses) pour usage ultérieur.



Figure 15 : Protocole de préparation des échantillons

Figure 15 : Illustration du protocole de préparation des échantillons. Le tissu biologique d'intérêt est homogénéisé dans la solution de mesure (#1) avant d'être centrifugé (#2). Les surnageant est ensuite récupéré (#3) afin de procéder aux mesures d'absorbances.

La MS est régulièrement préparée avant chaque expérience et une portion de celle-ci sert à la réalisation des solutions de calibration simultanément mesurées (analysées à la Figure 14). Ces solutions sont traitées comme des échantillons de tissus: des billes de téflon y sont incorporées, elles sont également « homogénéisées » à l'aide du broyeur mécanique et centrifugées, permettant ainsi d'assurer que les échantillons de tissu et de calibration soient traités de manière similaire.

Tel que précédemment indiqué, la composition de la MS décrite à la Figure 15 correspond à celle qui a été utilisée lors de toutes les expériences de calibration effectuées dans les sections précédentes de même que pour analyser les tissus biologiques d'intérêt. L'ensemble des réactifs chimiques cités dans la présente étude proviennent de Sigma Aldrich (Oakville, Ontario Canada) à l'exception de l'éthanol fourni par « Les alcools de Commerce » (Boucherville, Québec Canada).

Mesures d'absorbances

Le protocole de mesure décrit à la Figure 11 représente celui qui a été utilisé pour analyser les échantillons de muscles squelettiques. S'agissant des échantillons de cerveau, les mêmes étapes ont été suivies à l'exception du fait qu'un appareil de mélange automatique de plaques (The Jitterbug, modèle 130000 de Boekel industries Inc.; Feasterville Pennsylvanie USA) a été utilisé. En effet, des calibrations successives (similaires à celles décrites dans la section « développement de la nouvelle méthode ») ont permis de valider son utilisation. Il s'est avéré que le Jitterbug était plus efficace concernant le mélange des échantillons, une seule étape de mesure d'absorbance était donc nécessaire (au lieu de 2) et le mélange des différentes solutions ajoutées aux aliquotes se faisait pendant 1 min en utilisant le mode de mélange #7 de l'appareil. Le gain de temps occasionné était également conséquent.

Un lecteur de plaques (infinite M1000 plate reader de Tecan, Männedorf Suisse) a permis d'effectuer les mesures d'absorbance et ceci avec les plaques de mesures (96-well glass bottom microwell plates de Matrical; Spokane, Washington USA).

Une variabilité des concentrations en calcium dans le bruit de fond a été détectée d'un puits à l'autre de la plaque (se référer aux sections C et D de la Figure 1). Il a donc été décidé qu'une plaque contenant uniquement la MS dans les puits allait être mesurée avant et après l'analyse des tissus biologiques d'intérêt, permettant ainsi d'effectuer une correction spécifique à chaque échantillon (en soustrayant la proportion de Ca^{2+} associée dans le bruit de fond). Ces plaques sont utilisées suivant le protocole décrit à la Figure 11, d'une manière similaire à l'analyse des échantillons de tissus. 3 plaques successives sont donc régulièrement analysées, ce procédé ayant également été utilisé dans toutes les expériences de calibration précédemment mentionnées. La fraction de BAPTA typiquement liée au Ca^{2+} dans le bruit de fond était d'environ 3 à 4 %.

La même plaque est utilisée pour analyser les échantillons et fait donc l'objet d'un protocole de rinçage spécifique. Avant et après chaque utilisation, la plaque est rincée avec de l'eau purifiée (à haute résistance) 6 fois. Ensuite, 0,3 mL de solution de mesure est rajouté, imprégnant les puits d'intérêt pendant 5 min. L'objectif de cette manœuvre est de lier tout divalent (Ca^{2+} ou Zn^{2+}) ayant pu y rester logé malgré le rinçage à l'eau. La plaque est ensuite rincée 3 fois avec de l'eau purifiée avant incorporation des solutions à analyser.

Analyse des données d'absorbance

Les données obtenues sont analysées suivant le programme informatique développé par notre laboratoire (langage de programmation C# sous la plateforme Microsoft Visual Studio) et en utilisant précisément l'équation 16B de Lamboley *et al.*, 2015 (équation #5 de la présente étude). Des paramètres spécifiques au nouveau protocole ont été rajoutés, notamment concernant le TPEN et le zinc.

Différences entre le protocole développé et Lamboley et al., 2015

Le Tableau 6 récapitule l'essentiel des différences observées entre les deux méthodes BAPTA et permet d'apprécier l'efficacité associée au protocole nouvellement développé.

Tableau 6 : Comparaison du protocole développé avec celui de Lamboley *et al.*, 2015

	Lamboley <i>et al.</i>, 2015	Protocole actuel
Appareil de mesure	Spectrophotomètre	Lecteur de plaques
Valeurs mesurées	[Ca _T] + [Zn _T] combinées	[Ca _T] et [Zn _T] individuelles
Tissus étudiés	Muscles squelettiques	Muscles squelettiques et cerveau
Mesures simultanées	1 cuvette	96 puits
Broyage de l'échantillon	Manuel	Mécanique
[B_T]	0,15 mM	0,2 mM
[TPEN]	Non utilisé	50 µM
A₀ (EGTA)	1 mM final	2 mM final
A_∞ (Ca²⁺ en excès)	1 mM final	2 mM final
Mélange de l'échantillon	Manuel	Automatique
Calibration de la méthode	Occasionnelle	Simultanément à chaque plaque mesurée

[Ca_T] et [Zn_T] mesurées dans chaque groupe

Les tissus biologiques ont été analysés suivant le protocole décrit dans la section précédente. Les Tableaux 7, 8, et 9 représentent l'ensemble des résultats obtenus pour le groupe I (souris de 4 à 6 mois), le groupe II (souris de 7-11 mois) et le groupe III (souris de 2 mois), respectivement. Les unités de poids représentent le poids de tissu biologique humide.

Groupe I

Tableau 7 : Groupe I - Moyennes des valeurs de [Ca_T] et [Zn_T] (S.D.; S.E.M.)

Type de tissus	N	[Ca _T] (mmoles/kg)	[Zn _T] (mmoles/kg)	Proportion en zinc
Bulbes olfactifs	24	2,03	0,59	0,22
		(0,98; 0,20)	(0,64; 0,13)	
Cervelet	12	0,90	0,26	0,22
		(0,17; 0,05)	(0,31; 0,09)	
Hippocampe	24	1,18	0,62	0,34
		(0,34; 0,07)	(0,29; 0,06)	
Striatum	24	1,23	0,51	0,29
		(0,69; 0,14)	(0,20; 0,04)	
Cortex	12	0,90	0,30	0,25
		(0,07; 0,02)	(0,14; 0,04)	

Les valeurs de [Ca_T] et de [Zn_T] obtenues pour le groupe I varient entre 0,9 et 2,03 mmole/kg et entre 0,26 et 0,62 mmole/kg, respectivement. La [Ca_T] la plus élevée a été obtenue dans les bulbes olfactifs (2,03 mmole/kg) et la plus faible dans le cervelet et le cortex cérébral (0,9 mmole/kg chacun). S'agissant des [Zn_T], le maximum a été mesuré dans l'hippocampe (0,62 mmole/kg) et le minimum dans le cervelet (0,26 mmole/kg).

La proportion en zinc représente la valeur de [Zn_T] mesurée sur la somme des valeurs de ([Ca_T] + [Zn_T]) déterminées dans chaque région du cerveau étudiée. En d'autres termes, il s'agit de la proportion de la concentration totale en divalents associée à du Zn²⁺ et qui aurait

été assimilée à du Ca^{2+} si le nouveau protocole n'avait pas été développé. Cette proportion varie entre 22 et 34 %, ce qui constitue un biais majeur relatif à l'ancienne méthode BAPTA. Aussi, une distribution spécifique du zinc par région est suggérée par les résultats. De plus, la $[\text{Ca}_T]$ moyenne spécifiquement déterminée dans les régions du cerveau de ce groupe de souris est de 1,25 mmole/kg alors que la $[\text{Zn}_T]$ moyenne est de 0,46 mmole/kg. La figure 16, associé aux résultats du Groupe I, permet de noter que la $[\text{Zn}_T]$ ne semble pas être corrélée à la $[\text{Ca}_T]$ dans les régions du cerveau étudiées. En effet, les bulbes olfactifs comportent la $[\text{Ca}_T]$ maximale mesurée (2,03 mmole/kg) mais présentent une $[\text{Zn}_T]$ (0,59 mmole/kg) plutôt similaire à celle déterminée dans l'hippocampe (0,62 mmole/kg), malgré le fait que la $[\text{Ca}_T]$ mesurée dans cette région soit plus faible (1,18 mmole/kg).

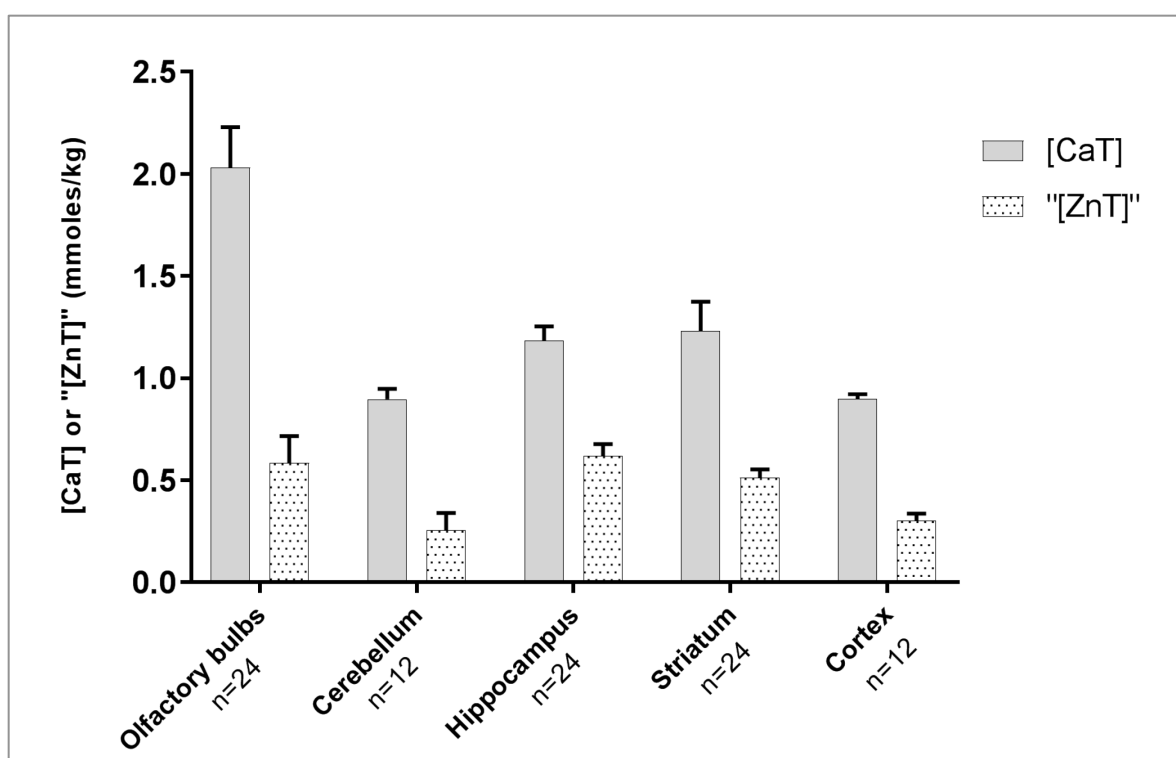


Figure 16 : Groupe I - Moyennes des $[\text{Ca}_T]$ et $[\text{Zn}_T]$ mesurées

Figure 16 : Valeurs moyennes de $[\text{Ca}_T]$ et de $[\text{Zn}_T]$ mesurées chez les souris du groupe I (âgées de 4 à 6 mois) dans 5 régions distinctes du cerveau: les bulbes olfactifs, le cervelet, l'hippocampe, le striatum et le cortex cérébral. Les barres d'erreurs représentent les S.E.M. (se référer au Tableau 7 et au texte correspondant pour plus d'explications).

Groupe II

Le Tableau 8 résume les données obtenues spécifiquement pour cette catégorie de souris.

Tableau 8 : Groupe II - Moyennes des valeurs de [Ca_T] et [Zn_T] (S.D.; S.E.M.)

Type de tissus	N	[Ca _T] (mmoles/kg)	[Zn _T] (mmoles/kg)	Proportion en zinc
Bulbes olfactifs	10	1,65	0,32	0,16
		(0,44; 0,14)	(0,16; 0,05)	
Hippocampe	10	1,37	0,44	0,24
		(0,38; 0,12)	(0,16; 0,05)	
Striatum	10	1,52	0,59	0,28
		(0,41; 0,13)	(0,38; 0,12)	
Cortex	5	1,24	0,18	0,13
		(0,20; 0,09)	(0,18; 0,08)	

Les valeurs de [Ca_T] et de [Zn_T] obtenues pour le groupe II varient entre 1,24 et 1,65 mmole/kg et entre 0,18 et 0,59 mmole/kg, respectivement. La [Ca_T] la plus élevée a été mesurée dans les bulbes olfactifs (1,65 mmole/kg) et la plus faible dans le cortex (1,24 mmole/kg). Concernant les [Zn_T], le maximum a été obtenu dans le striatum (0,59 mmole/kg) et le minimum dans le cortex (0,18 mmole/kg).

La proportion en zinc varie entre 13 et 28 %, dénotant une importante fraction de la concentration totale en divalents (calcium et zinc) associée spécifiquement au Zn²⁺. En effet, le divalent est présent de manière détectable et mesurable dans les régions étudiées.

La même observation qui avait été faite pour le Groupe I se reproduit pour le Groupe II, à savoir une distribution assez spécifique du zinc par région étudiée.

En résumé, la [Ca_T] moyenne mesurée est de 1,44 mmole/kg alors que la [Zn_T] moyenne est de 0,38 mmole/kg dans ce groupe de souris.

La figure 17 représente les résultats du Groupe II et permet notamment de remarquer une absence de corrélation existant entre les [Ca_T] et [Zn_T] au sein de la même région du cerveau.

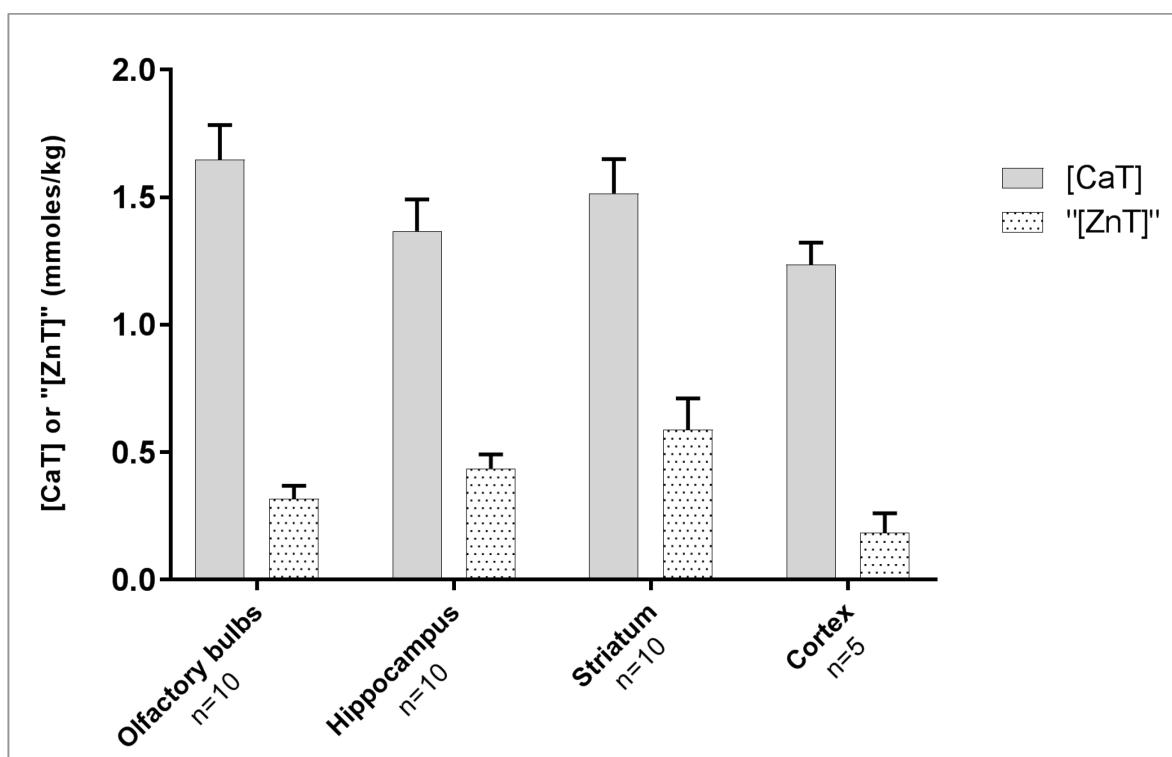


Figure 17 : Groupe II – Moyennes des [Ca_T] et [Zn_T] mesurées

Figure 17 : Valeurs moyennes de [Ca_T] et de [Zn_T] mesurées chez les souris du groupe II (âgées de 7 à 11 mois) dans 4 régions distinctes du cerveau: les bulbes olfactifs, l'hippocampe, le striatum et le cortex cérébral. Les barres d'erreurs représentent les S.E.M. Suite à un problème technique, les données des cervelets n'ont pas été exploitables. Se référer au Tableau 8 et au texte correspondant pour plus de détails.

Groupe III

Tableau 9 : Groupe III - Moyennes des valeurs de [Ca_T] et [Zn_T] (S.D.; S.E.M.)

Type de tissus	N	[Ca _T] (mmoles/kg)	[Zn _T] (mmoles/kg)	Proportion en zinc
EDL		3,28	0,25	0,07
	12	(0,49; 0,14)	(0,21; 0,06)	
Soleus		3,42	0,56	0,14
	12	(0,87; 0,25)	(0,35; 0,10)	

Le Tableau 9 présente les données obtenues concernant l'analyse des muscles squelettiques. Les valeurs moyennes de $[Ca_T]$ déterminées pour les muscles squelettiques étudiés restent assez similaires, avec 3,28 mmole/kg pour l'EDL et 3,42 mmole/kg pour soleus.

Par contre, les $[Zn_T]$ mesurées varient du simple au double, avec 0,25 mmole/kg pour l'EDL et 0,56 mmole/kg pour le soleus. Les $[Ca_T]$ ne semblent également pas être corrélées aux $[Zn_T]$ au sein du même muscle squelettique, résultant à la même observation que celle admise dans les régions du cerveau étudiées. En effet, la proportion de zinc dans l'EDL est de 7 % alors que celle dans le soleus est de 14 %. La prochaine section définira avec d'avantage de précision les tests statistiques utilisés pour comparer les données de différents groupes.

En outre, la $[Ca_T]$ moyenne mesurée au niveau des muscles squelettiques est de 3,35 mmole/kg alors que la $[Zn_T]$ moyenne est de 0,41 mmole/kg dans ce groupe de souris.

Comparaison des valeurs de $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ mesurées

Tests statistiques et comparaisons

Afin de mieux caractériser les données obtenues, des tests statistiques ont été effectués afin de vérifier si celles-ci suivent une distribution normale ainsi que si l'égalité des variances est vérifiée. En effet, ces deux assumptions permettront de définir le type de test statistique adéquat s'agissant de la comparaison simultanée de plusieurs groupes de données.

Distribution normale et homogénéité des variances

Le test de normalité de Shapiro Wilk (niveau de confiance de 95 %) a été utilisé afin de vérifier si les données déterminées dans la présente étude étaient normalement distribuées. Les valeurs de $[Ca_T]$ et de $[Zn_T]$ ont été analysées pour chaque type de tissu biologique et chaque groupe de souris. Nos résultats suivent majoritairement une distribution normale à l'exception des valeurs de $[Ca_T]$ obtenues dans les bulbes olfactifs ($p = 0,0093$) et le striatum ($p < 0,0001$) des souris du groupe I (âgées de 4 à 6 mois) de même que les données de $[Zn_T]$ déterminées dans le striatum ($p = 0,0043$) des souris du groupe II (âgées de 7 à 11 mois).

Concernant la détermination de l'égalité des variances, le test de Bartlett (niveau de confiance de 95 %) a été utilisé; permettant ainsi de montrer que les variances, dans les tissus biologiques et groupes de souris étudiés, sont différentes; autant pour les données relatives au calcium qu'au zinc ($p < 0,0001$).

Comparaison des groupes d'échantillons

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (niveau de confiance de 95 %) a d'abord été utilisé afin de déterminer si des différences significatives existaient au sein des groupes d'échantillons analysés ($p < 0,0001$ autant pour les valeurs de $[Ca_T]$ que de $[Zn_T]$). Ensuite, des comparaisons multiples - pour deux groupes de données à la fois - ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney (niveau de confiance de 95 %, échantillons non appariés) avec lequel les conclusions citées dans les sections suivantes ont été générées; permettant ainsi de déterminer si les différences observées étaient significatives. Le logiciel Graphpad Prism 7.04 a été utilisé pour effectuer l'ensemble des analyses statistiques.

Régions du cerveau (Groupe I) vs muscles squelettiques (Groupe III)

Tel qu'indiqué précédemment, les informations relatives aux sections de comparaison de données ont été obtenues grâce au test de Mann-Whitney avec un niveau de confiance de 95 %. Dans le cerveau (Groupe I), les $[Ca_T]$ mesurées dans les bulbes olfactifs sont significativement plus élevées que celles déterminées dans le cervelet ($p < 0,0001$), l'hippocampe ($p = 0,0003$), le striatum ($p < 0,0001$) et le cortex ($p < 0,0001$). De plus, les $[Ca_T]$ déterminées dans l'EDL ne sont pas significativement différentes de celles mesurées dans le soleus ($p = 0,3164$). Il est intéressant de noter que malgré le fait que les deux types de muscles squelettiques étudiés (EDL et soleus) présentent des différences fonctionnelles remarquables, les $[Ca_T]$ déterminées dans ces tissus sont similaires (se référer à la section « spécificités structurelles des muscles étudiées » de l'Introduction pour de plus amples renseignements). Par contre, les $[Ca_T]$ mesurées dans l'EDL sont significativement plus élevées que celles dans les bulbes olfactifs ($p = 0,0004$), le cervelet ($p < 0,0001$), l'hippocampe ($p < 0,0001$), le striatum ($p < 0,0001$) et le cortex ($p < 0,0001$).

Les $[Zn_T]$ mesurées dans le soleus sont significativement plus élevées que celles déterminées dans l'EDL ($p = 0,0045$) et le cortex ($p = 0,0107$). Toutefois, les $[Zn_T]$ déterminées dans les bulbes olfactifs ($p = 0,7396$), l'hippocampe ($p = 0,1979$), et le striatum ($p = 0,7396$) ne sont pas significativement différentes de celles mesurées dans le soleus. Les $[Zn_T]$ déterminées dans l'EDL ne sont pas significativement différentes de celles mesurées dans le cervelet ($p > 0,9999$) ou le cortex cérébral ($p = 0,3809$) tout en étant significativement différentes de celles déterminées dans les bulbes olfactifs ($p = 0,0411$), l'hippocampe ($p < 0,0001$) et le striatum ($p = 0,0011$).

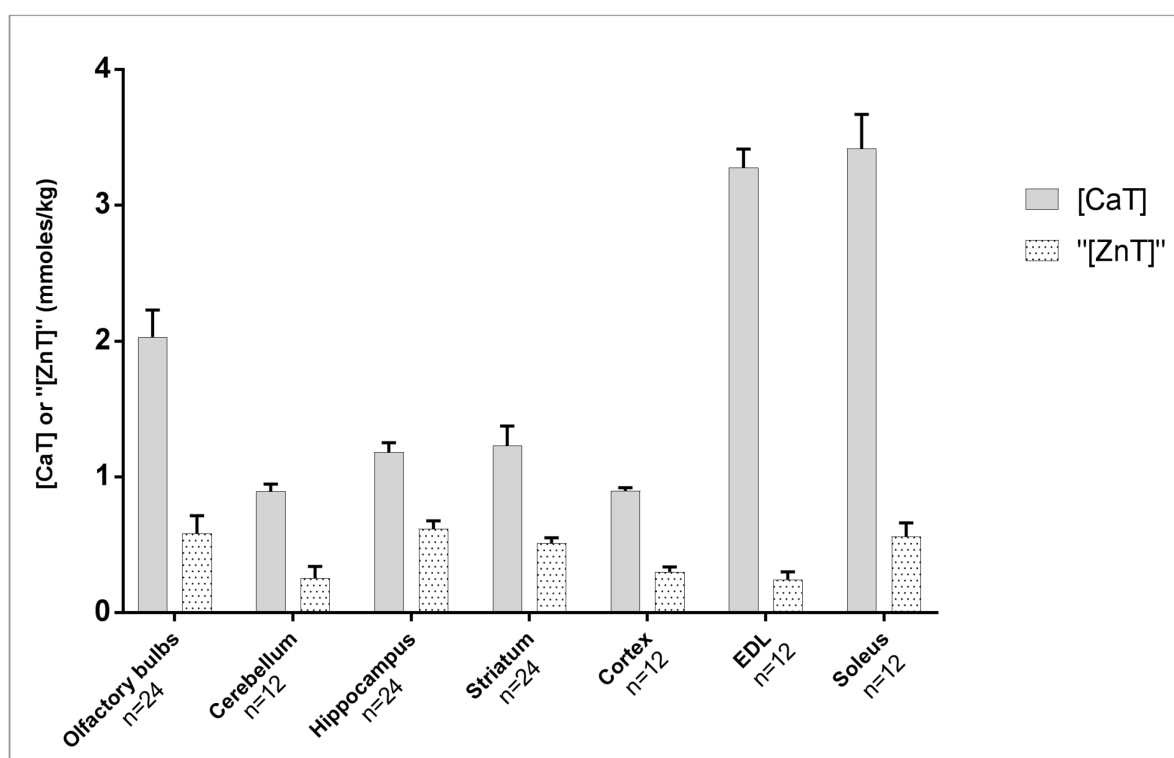


Figure 18 : $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ mesurées dans les régions du cerveau vs dans les muscles squelettiques

Figure 18 : Représentation des $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ mesurées dans les régions du cerveau étudiées chez les souris du groupe I comparativement aux valeurs déterminées dans les muscles squelettiques des souris du groupe III. Les barres d'erreurs représentent les S.E.M. La $[Ca_T]$ moyenne mesurée dans le muscle squelettique (3,35 mmol/kg) est plus élevée que celle déterminée dans le cerveau (1,25 mmol/kg). Les $[Ca_T]$ mesurées spécifiquement dans l'EDL sont significativement plus élevées que celles déterminées dans toutes les autres

régions du cerveau, tout en n'étant pas significativement différentes de celles mesurées dans le soleus. Les $[Zn_T]$ moyennes mesurées dans le soleus de souris (0,56 mmole/kg) sont significativement plus élevées que celles déterminées dans l'EDL de la même espèce (0,25 mmole/kg) de même que dans le cortex (0,18 mmole/kg). Toutefois, les valeurs de $[Zn_T]$ mesurées dans le soleus ne sont pas significativement différentes de celles déterminées dans les autres régions du cerveau étudiées, exception étant faite du cortex cérébral (se référer au texte associé à la figure pour plus d'informations). Les niveaux de significativité ont été déterminés avec le test de Mann-Whitney avec un degré de confiance de 95 %.

Variations de $[Ca_T]$ et de $[Zn_T]$ en fonction de l'âge (Groupe I vs Groupe II)

Les Figures 19 et 20 représentent les variations des $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$, respectivement, mesurées en fonction de l'âge.

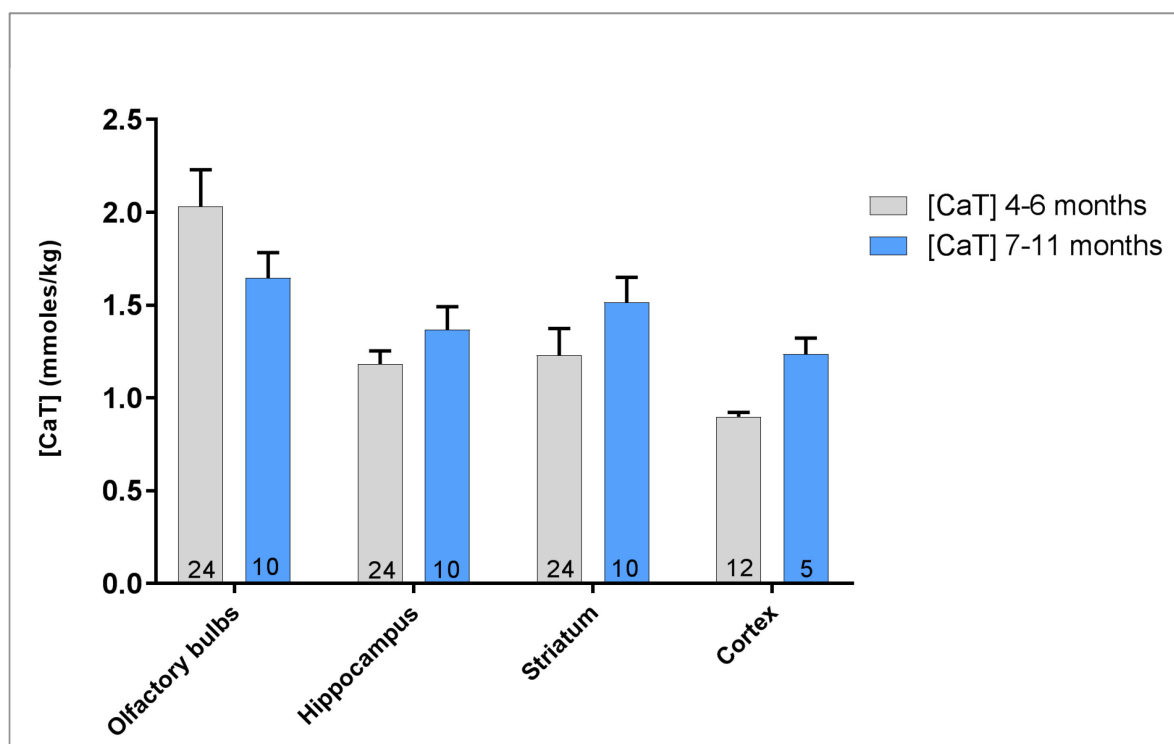


Figure 19 : Variations de $[Ca_T]$ mesurées en fonction de l'âge

Figure 19 : Représentation des $[Ca_T]$ mesurées dans le groupe I (souris contrôles âgées de 4 à 6 mois, barres grises) comparativement à celles du groupe II (souris âgées de 7 à 11 mois, barres bleues). Les chiffres indiqués dans chaque barre représentée correspondent au

nombre d'échantillons analysés (N). Les barres d'erreurs représentent les S.E.M. Le vieillissement a entraîné une augmentation significative des $[Ca_T]$ mesurées dans le cortex cérébral ($p = 0,0001$) et le striatum ($p = 0,0036$). Les niveaux de significativité ont été déterminés avec le test de Mann-Whitney avec un degré de confiance de 95 %.

Le vieillissement a été associé à une augmentation significative du contenu total en calcium dans le cortex cérébral ($p = 0,0001$ avec le passage de 0,9 mmole/kg à 1,24 mmole/kg en moyenne) et le striatum ($p = 0,0036$ avec le passage de 1,23 mmole/kg à 1,52 mmole/kg en moyenne).

Paradoxalement, le vieillissement a occasionné une diminution significative des $[Zn_T]$ mesurées (Figure 20) uniquement dans l'hippocampe ($p = 0,0252$).

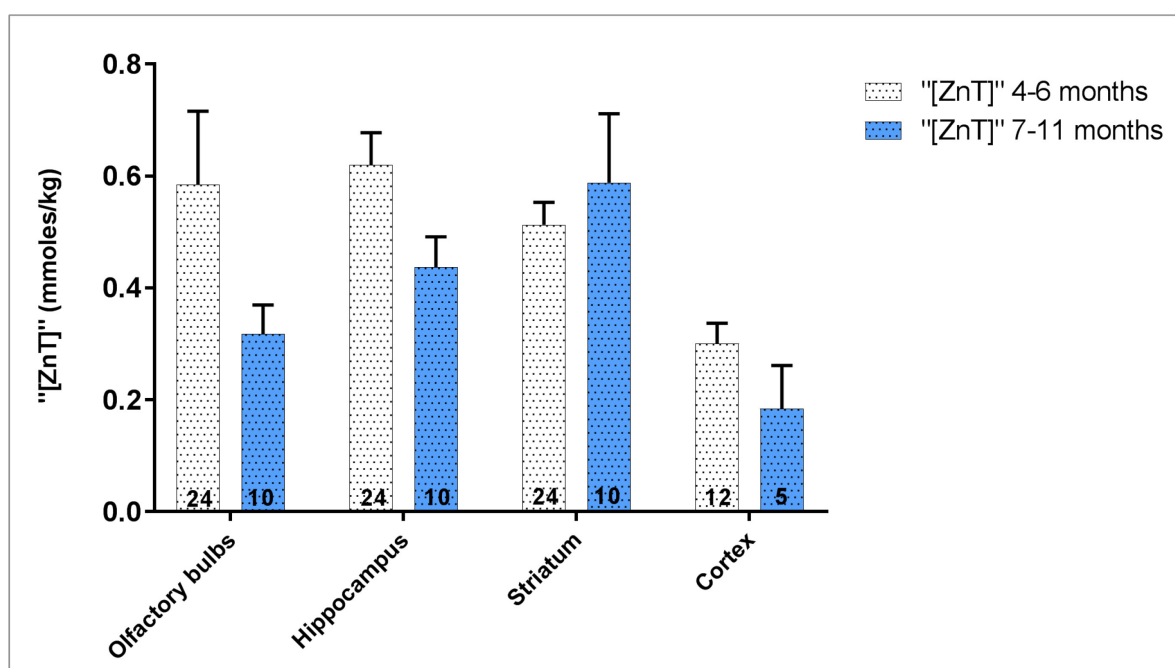


Figure 20 : Variations de $[Zn_T]$ mesurées en fonction de l'âge

Figure 20: Représentation des $[Zn_T]$ mesurées dans le groupe I (souris contrôle âgées de 4 à 6 mois, barres blanches) comparativement à celles du groupe II (souris âgées de 7 à 11 mois, barres bleues). Les chiffres indiqués dans chaque barre représentée correspondent au nombre d'échantillons analysés (N). Les barres d'erreurs représentent les S.E.M. Le vieillissement a entraîné une diminution significative des $[Zn_T]$ mesurées dans

l'hippocampe ($p = 0,0252$). Les niveaux de significativité ont été déterminés avec le test de Mann-Whitney avec un degré de confiance de 95 %.

Proportions en zinc mesurées avec la nouvelle méthode

La méthode nouvellement développée permet dorénavant de mesurer les concentrations en divalents (Ca^{2+} et Zn^{2+}) de manière individuelle, ce qui n'était pas le cas dans l'article de Lamboley *et al.*, 2015. La Figure 21 illustre la distribution de la proportion en zinc associée à chaque type de tissu étudié.

En incluant les 3 groupes de souris étudiées, la proportion en zinc la plus élevée a été déterminée dans l'hippocampe (31,4 %) suivi du striatum (28,9 %), avec un minimum détecté dans l'EDL (7 %). En moyenne, la proportion de zinc mesurée est de 23,6 % dans les régions du cerveau étudiées contre 10,5 % dans les muscles squelettiques.

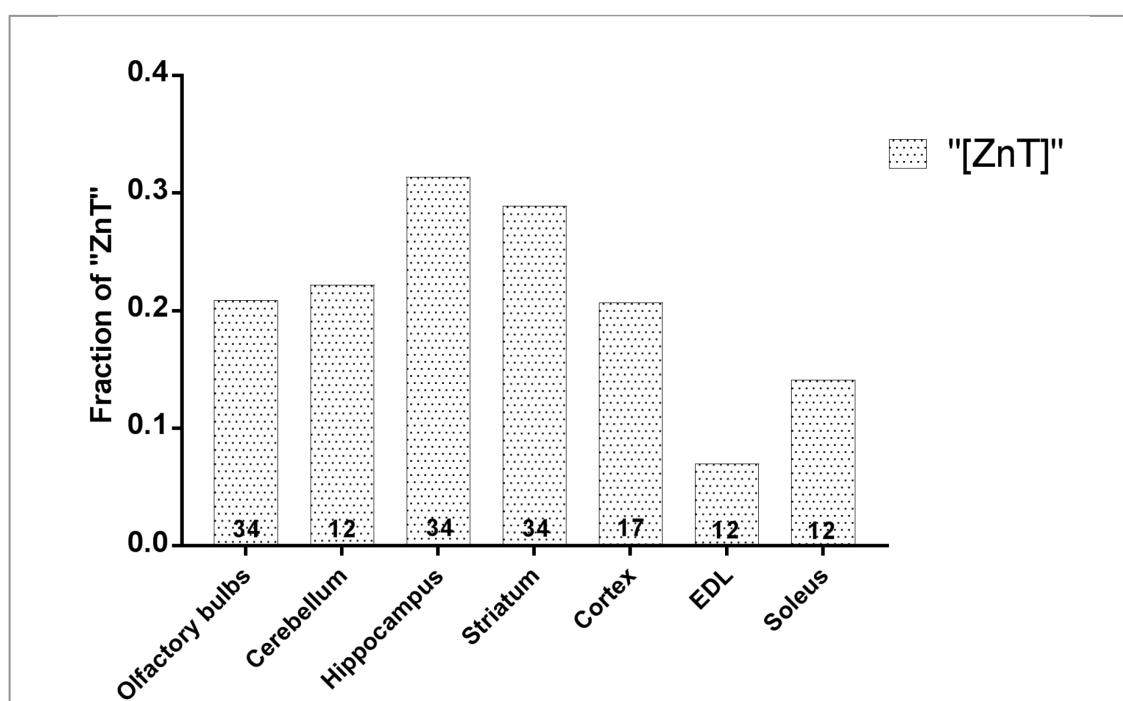


Figure 21 : Distribution tissulaire du zinc en termes de proportions

Figure 20: Représentation de la proportion en zinc mesurée dans les 3 groupes de souris étudiées: groupe I (souris contrôle âgées de 4 à 6 mois), groupe II (souris âgées de 7 à 11

mois) et groupe III (souris âgées de 2 mois). Les chiffres indiqués dans chaque barre représentée correspondent au nombre d'échantillons analysés (N).

DISCUSSION

D'abord, les valeurs déterminées dans notre étude seront comparées à celles présentes dans littérature. Par la suite, les impacts du vieillissement observés sur les $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ mesurées dans le cerveau seront discutés. Les limites liées à la méthode développée seront ensuite exposées pour enfin terminer avec la conclusion et les perspectives.

Comparaison des valeurs mesurées aux études antérieures

Le Tableau 10 présente toutes les valeurs de $[Ca_T]$ et de $[Zn_T]$ mesurées dans la présente étude, les données liées au cerveau étant des moyennes des 5 régions analysées (sauf pour les souris du groupe II où les cervelets sont exclus). Les valeurs de N correspondent au nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe.

Tableau 10 : Résumé des moyennes de $[Ca_T]$ et de $[Zn_T]$ par groupe (S.D.; S.E.M.)

	N	$[Ca_T]$ (mmoles/kg)	$[Zn_T]$ (mmoles/kg)	Proportion en zinc
Groupe I - Cerveau	12	1,25 (0,35; 0,10)	0,46 (0,24; 0,07)	0,27
Groupe II - Cerveau	5	1,44 (0,27; 0,12)	0,38 (0,18; 0,08)	0,20
Groupe III – muscles squelettiques	6	3,35 (0,49; 0,20)	0,41 (0,20; 0,08)	0,11

Données du cerveau

Yang et Wong, 2001 ont analysé des cerveaux de souris âgées de 2 mois en utilisant une méthode de spectrométrie d'émission optique couplée à un plasma inductif (ICP-AES); déterminant de manière simultanée les $[Ca_T]$ et $[Zn_T]$ qui étaient de 2,6 mmoles/kg et de 0,45 mmole/kg, respectivement, correspondant à une moyenne des valeurs associées au cortex, à l'hippocampe, au cervelet et au tronc cérébral. La valeur de $[Ca_T]$ déterminée par les auteurs est près de 2 fois supérieure à celle obtenue dans la présente étude (1,25

mmole/kg). Cependant, plusieurs différences existent entre nos approches respectives. En effet, Yang et Wong, 2001 ont basé leur étude sur des souris mâles, deux à trois fois plus jeunes que nos souris femelles et dont la race n'est pas spécifiée dans l'article. De plus, la moyenne de $[Ca_T]$ précédemment citée inclut le tronc cérébral (afin de prendre en compte toutes les zones du cerveau étudiées par les auteurs), région du cerveau qui n'a pas été analysée dans notre projet. Les valeurs de $[Ca_T]$ déterminées par les auteurs pourraient donc probablement être impactées par ces différences de protocole comparativement aux nôtres. Toutefois, Simons, 1988 affirme que la $[Ca_T]$ moyenne dans les neurones du système nerveux central serait d'environ 1 mmole/kg, valeur similaire à ce que nous avons mesuré (la méthode de mesure utilisée pour déterminer la valeurs citée par Simons, 1988 n'est pas spécifiée).

Paradoxalement, la $[Zn_T]$ mesurée par Yang et Wong, 2001 (0,45 mmole/kg) est très proche de celle déterminée dans notre étude (0,46 mmole/kg), confirmant notamment la validité de la méthode.

Données des muscles squelettiques

Mesure du calcium

Lamboley *et al.*, 2015 ont déterminé une $[Ca_T]$ moyenne de 2,67 mmoles/kg (concernant l'EDL et le soleus), une valeur environ 20 % plus faible que la nôtre (3,35 mmoles/kg). Prenant en compte le fait que leurs données incluaient une part masquée de Zn^{2+} , la différence entre nos études respectives devrait probablement être plus élevée. Par contre, Lamboley *et al.*, 2015 ont analysé des souris femelles âgées de 4 à 6 mois alors que dans la présente étude les souris du groupe III sont deux à trois fois plus jeunes (âgées de 2 mois). Cette différence d'âge a pu influencer les $[Ca_T]$ mesurées étant donné que les souris plus jeunes sont probablement physiquement plus actives que celles qui deviennent plus âgées. En effet, une étude de notre laboratoire a permis de détecter chez des souris manifestement plus agitées (grimpaient sur les grilles des cages et bougeaient de manière plus importante) des $[Ca_T]$ dans les muscles squelettiques (EDL et soleus) jusqu'à deux fois plus importantes, comparativement à des souris d'apparence plus calme (McDonnell et Pape, 2015). Dans le cadre de cette étude, le groupe de souris agitées n'avait préalablement été

exposé à aucune situation stressante comparativement à l'autre groupe. Il est important de noter qu'il n'a pas été possible de reproduire les résultats de cette expérience à ce jour, suggérant l'occurrence d'un état d'agitation spontanée des souris difficilement reproductible de manière expérimentale (McDonell et Pape, 2015).

Par ailleurs, une étude menée par notre laboratoire a indiqué une augmentation significative de la $[Ca_T]$ dans l'EDL de souris (de 26 %) après avoir soumis des souris femelles de 2 mois à de l'exercice (course pendant environ 10 min sur un tapis roulant réglé à une vitesse correspondant à 80% de la vitesse maximale que la souris peut générer). L'élévation de $[Ca_T]$ occasionnée dans le soleus n'était pas significative, suggérant que des mécanismes de régulation du calcium en condition d'augmentation de l'activité physique des muscles existent dans l'EDL et pas dans le soleus. D'autre part, il est intéressant de noter que malgré le fait que les deux types de muscles squelettiques étudiés (EDL et soleus de souris) présentent des différences structurelles, les $[Ca_T]$ déterminées dans ces tissus sont similaires (cela est également le cas dans Lamboley *et al.*, 2015). En effet, l'EDL de souris (C57BL/6) est majoritairement constitué de fibres de type II (dans l'ordre de 96 %; Augusto *et al.*, 2004) tandis que le soleus de souris (C57BL/6) comprend 63 % de fibres de type II (Augusto *et al.*, 2004; Tyagi *et al.*, 2017) et 37 % de fibres de type I (Augusto *et al.*, 2004; Tyagi *et al.*, 2017). D'un point de vue physiologique, les fibres de type II manifestent une vitesse de contraction rapide, se fatiguent vite et génèrent une grande force alors que les fibres de type I sont plutôt résistantes à la fatigue, développent une faible force de même qu'une vitesse de contraction lente (Marieb & Hoen, 2015, Chapitre 9: Les muscles et le tissu musculaire, page 358). Cependant, les résultats obtenus suggèrent l'existence d'autres mécanismes sous-jacents, autres que le contenu total en calcium, qui seraient responsables de ces spécificités fonctionnelles.

Mesure du zinc

La valeur de $[Zn_T]$ déterminée dans notre étude (0,41 mmole/kg) est très similaire à celle obtenue par Qian et Colvin, 2015 (0,36 mmole/kg) chez des rats mâles par ICP-MS (moyenne des muscles squelettiques soleus et plantaris; l'âge des animaux n'ayant pas été spécifié dans l'article). Comme les auteurs, nous avons également trouvé une $[Zn_T]$ significativement plus élevée dans le soleus comparativement à l'EDL, suggérant que le Zn^{2+} aurait des implications physiologiques spécifiques dans le soleus et ceci

indépendamment des espèces de rongeur étudiées (souris ou rat). En effet, les valeurs de $[Zn_T]$ déterminées dans notre étude sont corrélées à celles existant dans la littérature et ne semblent pas dépendre de l'espèce, de l'âge, du genre de l'animal étudié ou encore de la nature des tissus analysés, étant donné la similitude globale des $[Zn_T]$ déterminées dans nos 3 groupes de souris et les différentes comparaisons ayant été préalablement effectuées avec des études antérieures.

En résumé, nos résultats permettent de vérifier l'hypothèse 1 du projet. Des $[Zn_T]$ importantes ont effectivement pu être mesurées dans les muscles squelettiques avec une $[Zn_T]$ significativement plus élevée dans le soleus comparativement à l'EDL. D'avantage d'investigations seront nécessaires afin de pouvoir déterminer les implications physiologiques (ou pathophysiologiques) de cette observation, des pistes de réflexion étant proposées dans les perspectives.

Comparaison cerveau vs muscles squelettiques

Les $[Ca_T]$ mesurées dans le cerveau (1,25 mmole/kg) sont plus faibles que celles déterminées dans le muscle squelettique (3,35 mmole/kg) (Figure 18), suggérant que les niveaux de Ca^{2+} nécessaires à la contraction musculaire seraient plus importants que ceux requis dans le cadre des autres implications du divalent dans le cerveau (signalisation cellulaire, transmission synaptique, expression génétique, apprentissage - mémoire,...).

Par contre, les valeurs de $[Zn_T]$ déterminées spécifiquement dans le soleus (0,56 mmole/kg) ne sont pas significativement différentes de celles obtenus dans d'autres régions du cerveau telles que les bulbes olfactifs (0,59 mmole/kg) ou encore l'hippocampe (0,62 mmole/kg); à l'exception du cortex (où les valeurs de $[Zn_T]$ mesurées sont significativement plus faibles comparativement au soleus). Ce résultat est surprenant à deux égards : d'abord, il suggère que le Zn^{2+} aurait des implications physiologiques plus importantes dans le soleus que l'EDL alors que tous les deux tissus représentent des muscles squelettiques. Ensuite, la similitude entre la $[Zn_T]$ déterminée avec certaines régions du cerveau soutiendrait l'idée que le Zn^{2+} , en plus de ses implications probables dans la contraction musculaire, jouerait également un rôle dans la transcription génétique (Gower-Winter et Levenson, 2012) ou encore l'activation d'enzymes (Pitt et Stewart, 2015) tel que suggéré dans le cerveau.

En termes de localisation, nous pensons que le Zn^{2+} est très probablement séquestré par le SR ou le ER selon un mécanisme spécifique pouvant s'apparenter à celui de la capture du Ca^{2+} . Comme suggéré par la littérature, la CSQ semble être un candidat potentiel à la liaison du Zn^{2+} (Palmer *et al.*, 2006). S'agissant de la quantification de la CSQ dans l'EDL comparativement au soleus de rat, Murphy *et al.*, 2009 auraient mesuré une concentration plus élevée de CSQ1 dans l'EDL (36 $\mu\text{moles/l}$ de volume de fibre) par rapport au soleus (10 $\mu\text{moles/l}$ de volume de fibre), suggérant que cette molécule pourrait être impliquée dans certaines différences structurelles associées aux concentrations en divalents mesurées dans la présente étude (une étude spécifique de l'EDL et du soleus de souris devrait être menée afin d'analyser les différences pouvant exister entre espèces). Cependant, des recherches plus approfondies seront nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

En résumé, l'hypothèse 2 de notre étude (proposant que les implications des ions Ca^{2+} et Zn^{2+} seraient différentes dans le cerveau comparativement aux muscles squelettiques, entraînant ainsi des $[\text{Ca}_T]$ et de $[\text{Zn}_T]$ distincts dépendant du tissu étudié) n'est donc que partiellement vérifiée, vu que les $[\text{Ca}_T]$ mesurées sont plus importantes dans le muscle squelettique comparativement au cerveau. Par contre, les $[\text{Zn}_T]$ mesurées, globalement, restent assez similaires dans les régions du cerveau étudiées de même que dans le soleus, exception étant faite de l'EDL et du cortex cérébral.

Implications du vieillissement dans le cerveau

Augmentation du calcium avec l'âge

Le contenu total en calcium mesuré dans le striatum et le cortex cérébral des souris âgées de 7-11 mois (Groupe II) est significativement plus important que celui des souris de 4-6 mois (Groupe I) (Figure 19). Ce phénomène d'augmentation du contenu total en calcium lié à l'âge a été décrit dans la littérature, avec plusieurs hypothèses sous-jacentes pouvant apporter des éléments de réponse à cette observation (Gareri *et al.*, 1995).

De manière générale, le vieillissement entraîne une diminution de certaines fonctions du cerveau incluant la vision, l'ouïe, le goût, la mémoire et l'activité motrice (Gareri *et al.*, 1995). Des évidences expérimentales suggèrent également des altérations de la structure cellulaire, du noyau, de la synthèse d'ARN et de protéines de même que des déficits dans le

fonctionnement de divers systèmes neurotransmetteurs (par exemple: dopaminergiques et cholinergiques) (Gareri *et al.*, 1995). Plus précisément, le vieillissement implique une élévation du nombre de canaux et des courants calciques, entraînant une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ pouvant expliquer l'occurrence de plusieurs déficiences cognitives (notamment associées à la diminution de l'excitabilité nerveuse) (Gareri *et al.*, 1995). Il semble ainsi raisonnable de considérer que l'augmentation de $[Ca_T]$ liée à l'âge pourrait être due à un mécanisme de compensation du cerveau relatif à certaines pertes de fonctions physiologiques associées au vieillissement.

Deux mécanismes majeurs de transport du Ca^{2+} hors du cytosol existent au niveau du cerveau: un dépendant de la calmoduline- Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase et l'autre constitué de l'échangeur Na^+ - Ca^{2+} (Gareri *et al.*, 1995). L'efficacité de ces deux mécanismes de régulation du contenu en calcium semblerait être modifiée durant le vieillissement, entraînant des concentrations plus importantes en Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire (Gareri *et al.*, 1995).

Par ailleurs, les propriétés des canaux calciques voltage dépendants semblent également subir des modifications avec l'âge, entraînant des potentiels plus prolongés en raison de l'augmentation de l'activité de certains canaux calciques de type L (Gareri *et al.*, 1995).

De plus, les altérations de la structure membranaire des cellules de même que des niveaux d'énergie cellulaires (notamment liées à des changements dans le métabolisme du glucose) sembleraient influencer sur les dysfonctionnements associés à la régulation du Ca^{2+} (Gareri *et al.*, 1995).

L'excitotoxicité représente un autre mécanisme suggéré dans le cadre des altérations de l'homéostasie du Ca^{2+} liées à l'âge (se référer à la section « Choix des tissus biologiques à analyser » pour de plus amples détails relatifs à la dérégulation de l'homéostasie du Ca^{2+} en conditions pathologiques). En effet, la libération excessive de glutamate provoquerait une entrée de Ca^{2+} en excès dans le neurone, entraînant ainsi une rupture de l'homéostasie du calcium suite à l'incapacité de la cellule à gérer cet apport soudain (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 12 : Le système nerveux central, page 543). De plus, le Ca^{2+} aurait la possibilité d'endommager les mitochondries en favorisant la production de radicaux libres pouvant détruire les cellules et activer l'apoptose ou encore de déclencher la synthèse de plusieurs protéines, certaines stimulant l'apoptose et d'autres représentées par des agents

inflammatoires (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 12 : Le système nerveux central, page 543).

Toutefois, un élément important à souligner est que les différences en $[Ca_T]$ mesurées dans les diverses régions du cerveau, associées à l'âge, ne sont pas significatives à l'exception du cortex cérébral et du striatum. Le striatum (élément des ganglions de la base) de même que le cortex sont deux régions du cerveau touchées dans le cadre de la dégénérescence associée à HD (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 12: Le système nerveux central, page 544). Il est intéressant de noter que notre étude semble suggérer une implication pathologique probable de l'augmentation en $[Ca_T]$ spécifiquement dans ces régions du cerveau.

Le manque de significativité des résultats relatifs aux autres régions du cerveau pourrait probablement être lié à l'appartenance des groupes I et II à des intervalles d'âge assez proches (4-6 mois vs 7-11 mois).

Diminution du zinc avec l'âge

Les $[Zn_T]$ mesurées dans l'hippocampe des cerveaux de souris âgées de 7-11 mois (Groupe II) sont significativement plus faibles que celles des souris de 4-6 mois (Groupe I) (Figure 20), suggérant une implication pathologique du Zn^{2+} lors du vieillissement comparativement aux conditions contrôles. De plus, l'hippocampe est une des régions les plus touchées chez les patients atteints d'AD (Marieb & Hoen, 2015; Chapitre 11: Le système nerveux : notions de base, page 454). Il est intéressant de noter que notre étude semble également suggérer une implication pathologique probable de la diminution en $[Zn_T]$ spécifiquement dans cette région du cerveau.

Le Zn^{2+} est un divalent jouant un rôle primordial dans plusieurs phénomènes physiologiques. En effet, il représente un cofacteur catalytique indispensable à la fonctionnalité de nombreuses enzymes ou encore l'activation d'enzymes (Pitt et Stewart, 2015), permet de réguler l'expression génétique (Gower-Winter et Levenson, 2012) et serait impliqué dans la transmission synaptique (Colvin et *al.*, 2003; Yamasaki et *al.*, 2007). Il est donc raisonnable de considérer qu'une diminution des valeurs de Zn^{2+} en deçà de celles requises dans le cadre d'un fonctionnement physiologique optimal aura des conséquences directes sur les mécanismes précités.

De plus, des évidences suggèrent que le Zn^{2+} aurait la possibilité d'interagir avec les récepteurs NMDA et GABA_A (Smart *et al.*, 2004), impliquant donc une modulation directe du message nerveux par le divalent et illustrant ainsi tout le caractère toxique du Zn^{2+} lorsqu'il est mal régulé, notamment en conditions pathologiques (Sensi *et al.*, 2009) et probablement lors du vieillissement (se référer à la section « Choix des tissus biologiques à analyser » de l'Introduction pour plus d'informations).

Des déficiences en Zn^{2+} ont été reliées à plusieurs symptômes comportementaux tels que des altérations de la mémoire, de la léthargie, et une plus grande susceptibilité au stress chez des animaux adultes (Colvin *et al.*, 2003). Ensuite, plusieurs études ont identifié une diminution des niveaux en Zn^{2+} dans le sérum de patients atteints d'AD comparativement aux groupes contrôles, suggérant l'existence de déficiences en Zn^{2+} chez ces patients (Gower-Winter et Levenson, 2012).

Limites liées à la méthode développée

La nouvelle méthode BAPTA reste macroscopique

Les $[\text{Ca}_T]$ et $[\text{Zn}_T]$ mentionnées dans notre étude représentent une combinaison des concentrations intracellulaires et extracellulaires mesurées pour chaque type de tissu étudié (valeurs pour le tissu entier). Dans le muscle squelettique, la contribution du compartiment intracellulaire dans la valeur de $[\text{Ca}_T]$ mesurée est prépondérante (Rigoard *et al.*, 2009; Lamboley *et al.*, 2015). En effet, tel qu'indiqué par Lamboley *et al.*, 2015 dans leurs équations 23c et 23d, 77 % et 87 % du contenu total en calcium de l'EDL et du soleus, respectivement, résident dans le SR au repos. Toutefois, le cerveau comporte un fluide interstitiel (assimilable au compartiment extracellulaire) ayant une $[\text{Ca}_T]$ équivalente à celle du compartiment intracellulaire (d'environ 1 mmole/kg; Simons, 1988). Aussi, le cerveau présente une cytologie particulière, étant également composé de cellules gliales en plus des neurones (Mota et Herculano-Houzel, 2014). En effet, la proportion moyenne minimale de masse gliale au niveau des cerveaux de rongeurs serait de l'ordre de 20 % (Mota et Herculano-Houzel, 2014), ce qui pourrait influencer sur les valeurs de $[\text{Ca}_T]$ mesurées selon le contenu en Ca^{2+} associé aux cellules gliales. Par ailleurs, la fraction de masse neuronale pourrait se situer entre 60 et 80 % chez le mammifère (Mota et Herculano-Houzel, 2014).

Même si les valeurs de $[Ca_T]$ et de $[Zn_T]$ mesurées seront d'intérêt pour la recherche s'intéressant à ces deux divalents, notre projet ne permet néanmoins pas d'effectuer de distinction concernant les proportions provenant des différents types de compartiments ou encore des types cellulaires étudiés. Le protocole mis en place dans la présente étude permet de mesurer les contenus totaux en calcium et en zinc dans des tissus biologiques d'intérêt afin de pouvoir déceler les tendances liées à la régulation de ces divalents sous différentes conditions (normales ou pathologiques). Plus d'éléments seront évoqués dans les perspectives s'agissant de l'utilisation de techniques plus spécifiques notamment afin d'assurer une précision accrue relativement aux compartiments et types cellulaires analysés.

Le TPEN a une grande affinité pour d'autres divalents

Les mesures associées à notre étude ont été réalisées en admettant que la liaison TPEN- Zn^{2+} était sélective. Cependant, la littérature prouve que le TPEN, autant que le BAPTA et l'EGTA, lieront également d'autres divalents tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}).

Ayant une affinité relativement faible avec le Mg^{2+} ($10^{-1,7}$ M ; Arslan *et al*, 1985), le TPEN devrait lier une quantité négligeable de Mg^{2+} en conditions physiologiques (concentration intracellulaire d'environ 10^{-3} M; Arslan *et al*, 1985). De plus, toutes les expériences de calibration menées dans la présente étude ont été réalisées avec une solution de mesure contenant 2 mM de magnésium et la très grande résolution obtenue relativement aux concentrations mesurées ($[Ca_T]$ et $[Zn_T]$) prouve que cet ion n'interfère pas avec la nouvelle méthode. Par conséquent, les spécificités de la liaison TPEN- Mg^{2+} ne seront pas pris en compte dans les prochains paragraphes.

Tableau 11: Chélateurs et leurs constantes d'affinité (M)

Chélateurs	$K_{dZn} (M)$	$K_{dCa} (M)$	$K_{dFe} (M)$	$K_{dCu} (M)$
BAPTA	$8,0 \times 10^{-9}$	$1,6 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-12}$
EGTA	$7,8 \times 10^{-12}$	$0,4 \times 10^{-9}$	$1,6 \times 10^{-12}$	$2,0 \times 10^{-18}$
TPEN	$2,6 \times 10^{-16}$	$1,3 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-15}$	$3,0 \times 10^{-20}$

Le Tableau 11 présente les différentes constantes d'affinité relatives aux chélateurs utilisés dans la technique nouvellement développée (Li, 2012; Opazo *et al.*, 2006; Colvin *et al.*, 2008; Arslan *et al.*, 1985; Britigan *et al.*, 1998; Hyun *et al.*, 2001).

En conditions expérimentales, le BAPTA liera tout le Ca^{2+} , le Zn^{2+} , le Fe^{2+} et le Cu^{2+} présents dans l'échantillon lorsque le tissu biologique d'intérêt est homogénéisé dans la solution de mesure (A_M). L'ajout consécutif de TPEN entraîne la capture du Zn^{2+} , du Fe^{2+} et du Cu^{2+} , laissant le Ca^{2+} lié au BAPTA (A_{Z0}). Le TPEN présente effectivement des constantes d'affinité plus élevées pour ces divalents comparativement au BAPTA (se référer au Tableau 2). L'EGTA capturera ensuite tout le Ca^{2+} du BAPTA, la liaison du TPEN aux autres divalents n'étant pas influencée (A_0). Le changement d'absorbance $A_0 - A_{Z0}$ permet de calculer la $[Ca_T]$ alors que la différence $A_{Z0} - A_M$ correspond non seulement aux proportions totales en zinc mais également en cuivre et en fer.

En résumé, les $[Ca_T]$ déterminées dans notre étude ne sont pas influencées par les propriétés de liaison des chélateurs (BAPTA et EGTA) à d'autres divalents, essentiellement parce que le TPEN sera en mesure de capturer la totalité du Cu^{2+} et du Fe^{2+} . Par contre, les valeurs de $[Zn_T]$ mesurées, particulièrement dans le cerveau, comportent une portion de fer et de cuivre (en proportions non déterminées). Il est raisonnable de considérer que les niveaux physiologiques de ces divalents devraient être négligeables dans les muscles squelettiques (des recherches supplémentaires restent nécessaires spécifiquement dans le cadre de la présence et de l'implication de ces divalents dans le muscle squelettique).

Toutefois, il est important de noter que l'objectif principal de ce projet était d'arriver à rendre la mesure du Ca^{2+} plus précise en supprimant la compétition qui existait avec le Zn^{2+} au niveau des sites de liaison du BAPTA. Cet objectif a été atteint, malgré la compétition

qui existe à présent entre le Zn^{2+} , le Fe^{2+} et le Cu^{2+} concernant les sites de liaison disponibles au niveau du TPEN.

Conclusions et perspectives

Conclusions

Mon projet de maîtrise a permis l'amélioration de l'ancienne méthode BAPTA décrite dans Lamboley *et al.*, 2015, permettant dorénavant la mesure des $[\text{Ca}_T]$ et $[\text{Zn}_T]$ de manière individuelle notamment grâce à l'introduction du TPEN. Les multiples calibrations effectuées de même que la résolution des divers problèmes rencontrés ont permis une meilleure compréhension de certaines dynamiques impliquées lors de l'utilisation simultanée de différents chélateurs (concentrations, K_d , mesures d'absorbances, mélange des aliquotes), illustrant ainsi l'atteinte de l'objectif #1 du projet (à savoir le développement et la fiabilisation d'une méthode permettant la mesure individuelle de $[\text{Ca}_T]$ et de $[\text{Zn}_T]$ présents simultanément dans l'échantillon de tissu).

Une grande force de notre étude est représentée par le fait que nous sommes à présent capables de mesurer les $[\text{Ca}_T]$ de manière autonome dans le laboratoire en utilisant une méthode que nous avons développée. De plus, nous avons réussi à prouver que la technique était applicable à d'autres tissus biologiques, en mesurant les $[\text{Ca}_T]$ du tissu entier de manière fiable et précise; validant ainsi l'atteinte de l'objectif #2 du projet (à savoir la mesure de $[\text{Ca}_T]$ et de $[\text{Zn}_T]$ dans le cerveau et les muscles squelettiques choisis). De même, d'autres types de tissus biologiques pourraient également être analysés en utilisant le protocole décrit à la section « Méthodes ».

La nouvelle méthode BAPTA se démarque par sa simplicité et son efficacité, beaucoup d'échantillons pouvant être analysés à la fois et ne nécessitant pas la réalisation préalable de manœuvres complexes de type digestion de tissus (comparativement à d'autres méthodes de spectroscopie). C'est une méthode directe et reproductible, comme prouvé à travers les résultats obtenus.

Toutefois, le TPEN est un chélateur qui présente également une grande affinité pour d'autres divalents tels que le Fe^{2+} et le Cu^{2+} (Hyun *et al.*, 2001; Arslan *et al.*, 1985), entraînant une mesure représentant non seulement le Zn^{2+} mais également associée au Fe^{2+} .

et au Cu^{2+} . Contrairement aux muscles squelettiques, la présence de ces deux divalents ne serait pas négligeable dans le cerveau (Yang et Wong, 2001). L'utilisation de méthodes d'analyse complémentaires sera donc nécessaire à la détermination des proportions exactes en zinc, fer et cuivre dans les échantillons biologiques d'intérêt.

Perspectives

Distinction des compartiments intracellulaire, extracellulaire et spécificité cellulaire

Afin de déterminer la contribution exacte de chaque type de compartiment, des méthodes d'isolation cellulaires pourront être utilisées afin d'appliquer la méthode BAPTA uniquement aux régions à étudier et non au tissu biologique entier. Il sera également envisageable d'isoler le type cellulaire d'intérêt (neurones ou cellules gliales) préalablement à l'utilisation de la méthode BAPTA (des études portant sur un type d'isolation de fibres musculaires ont pu être réalisées dans la littérature; se référer à Pape *et al.*, 2007). Si l'isolation s'avère complexe, une investigation portant sur l'identification de régions du cerveau présentant une certaine homogénéité s'agissant du type de cellules présentes pourra être effectuée et ces régions pourront être privilégiées dans le but d'étudier un seul type de cellule à la fois. Cette approche reste applicable à d'autres tissus d'intérêt. Il est important de souligner que nos résultats peuvent être assimilables à ceux découlant d'expériences *in vivo* considérant qu'il ne devrait plus y avoir d'échanges avec l'extérieur du tissu lorsque le flux sanguin cesse après l'euthanasie de l'animal. Toutefois, lors de l'isolation de cellules, il est raisonnable de considérer que les concentrations en divalents mesurées puissent changer de manière significative.

Aussi, les données de la littérature pourront être utilisées afin de connaître la distribution exacte du divalent étudié selon le type de tissu analysé (proportion dans le milieu intracellulaire vs extracellulaire).

Comparaison entre genres et espèces

Notre étude ayant porté sur des souris femelles, il sera intéressant de mener des analyses sur des souris mâles de même que chez d'autres espèces afin de déterminer si des différences significatives seront détectées en fonction de ces paramètres et dans le but de mieux comprendre les caractéristiques physiologiques pouvant affecter la distribution des ions Ca^{2+} et Zn^{2+} dans différentes régions d'intérêt.

Perspectives du projet

Les objectifs 1 et 2 du projet ont été atteints. Il s'agira à présent de mesurer les concentrations en divalents (Ca^{2+} et Zn^{2+}) en conditions pathologiques, par exemple chez des souris atteintes de AD ou HD (objectif #3). Des méthodes de spectroscopie complémentaires (AAS, ICP-MS) pourront être utilisées afin de déterminer les proportions exactes de zinc, fer et cuivre dans les régions du cerveau analysées. Aussi, cette étude permettra de déterminer si ces pathologies affectent les $[\text{Ca}_T]$ et $[\text{Zn}_T]$ au niveau de muscles squelettiques. Il sera important d'analyser l'impact de ces maladies neurodégénératives sur la locomotion, spécifiquement au niveau de muscles squelettiques où les concentrations totales en calcium pourraient connaître des variations significatives. Concernant les concentrations totales en zinc, il s'agira d'une étude exploratoire qui pourrait éventuellement mettre la lumière sur les implications physiologiques et pathophysiologiques de ce divalent dans le muscle squelettique.

Le dernier volet de la présente étude est représenté par l'analyse des mécanismes de régulation des $[\text{Ca}_T]$ et $[\text{Zn}_T]$, notamment grâce à la détermination de l'origine et la localisation exacte du Zn^{2+} dans le muscle squelettique (objectif #4). Cette analyse pourra se faire en utilisant la technique de « cut-fiber » consistant à l'étude des courants transitoires de Zn^{2+} en présence d'indicateurs fluorescents sensibles au divalent (Pape *et al.*, 2007).

Proposition de projet de vieillissement pour l'application de la méthode BAPTA

La prochaine étude d'application de la méthode BAPTA pourrait comporter une cohorte de souris et de rats mâles et femelles avec un N de 30 pour chaque espèce. Les données contrôles seront obtenues avec l'euthanasie d'un nombre déterminé d'animaux en début d'expérience. Les cerveaux de même que les muscles squelettiques seront analysés afin de déterminer les $[\text{Ca}_T]$ et la somme des ($[\text{Zn}_T] + [\text{Cu}_T] + [\text{Fe}_T]$). L'ICP-MS pourra être utilisé afin de déterminer la proportion de chaque divalent dans cette somme (en collaboration avec l'unité de chimie analytique du département Chimie de l'Université de Sherbrooke).

Chaque 3 mois, un groupe de souris et de rats pourront être euthanasiés afin de réaliser les mêmes expériences que celles précédemment décrites et comparer les valeurs obtenues. Le projet permettra de déterminer les impacts du vieillissement dans les espèces étudiées et

également de comparer les concentrations en divalents dans le cerveau et les muscles squelettiques dans un même animal. Cette étude rendra possible l'obtention de données plus précises concernant les implications du vieillissement sur les concentrations en divalents précités, permettant notamment d'acquérir des données de l'ensemble des régions du cerveau et de comparer leur évolution sur plusieurs mois.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Aizenman, E., Stout, A. K., Hartnett, K. A., Dineley, K. E., BethAnn McLaughlin, B. et Reynolds I. J. (2000) Induction of Neuronal Apoptosis by Thiol Oxidation: Putative Role of Intracellular Zinc Release. *Journal of Neurochemistry* 75 (5): 1878-1888.
- Almeida-Silveira, M. I., Pérot, C., Pousson, M. et Goubel, F. (1994) Effects of stretch-shortening cycle training on mechanical properties and fibre type transition in the rat soleus muscle. *Pflüger Archiv.* 427(3-4): 289-294.
- Alvarez-Leefmans, F. J., Rink, T. J. et Tsien, R. Y. (1981) Free calcium ions in neurones of *Helix Aspersa* measured with ion-selective micro-electrodes. *J. Physiol.* 315: 531-548.
- Ariano, M. A., Armstrong, P. B. et Edgerton, V. P. (1973) Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21(1): 51-55.
- Armstrong, R. B. et Phelps, R. O. (1984) Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 171(3): 259-272.
- Arslan, P., Di Virgilio, F., Beltrame, M., Tsien, R. Y. et Pozza, T. (1985) Cytosolic Ca^{2+} Homeostasis in Ehrlich and Yoshida Carcinomas. *The journal of Biological Chemistry* 260 (5): 2719-2727.
- Augusto, V. Padovani, C. R. et Rocha Campos G. E. (2004) Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(2): 89-94.
- Bers, D. M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415(10): 198-205.

Benveniste, H., Jorgensen, M. B., Diemer, N. H. et Hansen, A. J. (1988) Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia. *Acta Neurologica Scandinavica* 78(6): 529-536.

Beyersmann, D. et Haase, H. (2001) Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *BioMetals* 14: 331-341.

Borle, A. B. (1990) An Overview of Techniques for the Measurement of Calcium Distribution, Calcium Fluxes, and Cytosolic Free Calcium in Mammalian Cells. *Environmental Health Perspectives* 84: 45-56.

Boron, W. F. et Boulpaep, E. L. (2012) Cellular physiology of skeletal, cardiac and smooth muscle. *Medical Physiology: a cellular and molecular approach*. Philadelphia: Elsevier (2e éd.), 450-498.

Bossy-Wetzel, E., Talantova, M. V., Lee, W. D., Scholzke, M. N., Harrop, A., Mathews, E., Gotz, T., Han, J., Ellisman, M. H., Perkins, G. A. et Lipton, S. A. (2004) Crosstalk between Nitric Oxide and Zinc Pathways to Neuronal Cell Death Involving Mitochondrial Dysfunction and p38-Activated K⁺ Channels. *Neuron* 41: 351-365.

Brautigan, D. L., Bornstein, P. et Gallis, B. (1981) Phosphotyrosyl-protein Phosphatase specific inhibition by Zn²⁺. *The Journal of Biological Chemistry* 256(13): 6519-6522.

Britigan, B. E., Rasmussen, G. T. et Cox, C. D. (1998) Binding of Iron and Inhibition of Iron-Dependent Oxidative Cell Injury by the “Calcium Chelator” 1,2-Bis(2-Aminophenoxy)Ethane *N,N,N',N'*- tetraacetic Acid (BAPTA). *Biochemical Pharmacology* 55: 287-295.

Brose, N., O'Connor, V. et Skehel, P. (2010) Synaptopathies: Dysfunction of Synaptic Function. *Biochem. Soc. Trans.* 38: 443-444.

Bush, A. I., Pettingell, W. H., Multhaup, G., Paradis, M. D., Vonsattel, J. P., Gusella, J. F., Beyreuther, K., Masters, C. L. et Tanzi, R. E. (1994a) Rapid Induction of Alzheimer A β Amyloid Formation by Zinc. *Science* 265:1464-1467.

Bush, A. I., Pettingell, W. H., Paradis, M. D. et Tanzi, R. E. (1994b) Modulation of A β Adhesiveness and Secretase Site Cleavage by Zinc. *The Journal of Biological Chemistry* 269(16): 12152-12158.

Caputo, C., Bolaños P., Ramos M. et DiFranco, M. (2016) Differential effects of contractile potentiators on action potential induced Ca²⁺ transients of frog and mouse skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 37: 169-180.

Cerbai, F., Lana, D., Nosi, D., Petkova-Kirova, P., Zecchi, S., Brothers, H. M., Wenk, G. L. et Giovannini, M. G. (2012) The Neuron-Astrocyte-Microglia Triad in Normal Brain Ageing and in a Model of Neuroinflammation in the Rat Hippocampus. *PLoS One* 7(9) e45250.

Chen, S. et Hillman, D. E. (1999) Dying-back of Purkinje cell dendrites with synapse loss in aging rats. *Journal of Neurocytology* 28: 187-196.

Chopard, A., Pons, F. et Marini J. F. (2001) Cytoskeletal protein contents before and after hindlimb suspension in a fast and slow rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol* 280: 323-330.

Clay, J. R. (2009) Determining K⁺ channel activation curves from K⁺ channel currents often requires the Goldman–Hodgkin–Katz equation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 3(20): 1-6.

Colvin, R. A., Fontaine, C. P., Laskowski, M. et Thomas, D. (2003) Zn²⁺ transporters and Zn²⁺ homeostasis in neurons. *European Journal of Pharmacology* 479: 171-185.

Colvin, R. A., Bush, A. I., Volitakis, I., Fontaine, C. P., Thomas, D., Kikuchi, K., et Holmes, W. R. (2008) Insights into Zn^{2+} homeostasis in neurons from experimental and modeling studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294: C726-C742.

Cozen, B. et Reithmeiera, R. A. F. (1984) Size and Shape of Rabbit Skeletal Muscle Calsequestrin. *The Journal of Biological Chemistry* 259(10): 6248-6252.

Demuro, A., Parker, I. et Stutzmann, G. E. (2010) Calcium Signaling and Amyloid Toxicity in Alzheimer Disease. *The Journal of Biological Chemistry* 285(17): 12463-12468.

Dittmer, P. J., Miranda, J. G., Gorski, J. A. et Palmer, A. E. (2009) Genetically Encoded Sensors to Elucidate Spatial Distribution of Cellular Zinc. *The Journal of Biological Chemistry* 284(24): 16289-16297.

Dorszewskaa, J., Adamczewska-Goncerzewicz, Z. et Szczech, J. (2004) Apoptotic proteins in the course of aging of central nervous system in the rat. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 139: 145-155.

Egginton, S. (1990) Numerical and areal density estimates of fibre type composition in a skeletal muscle (rat extensor digitorum longus). *J. Anat.* 168: 73-80.

Endo, M. (2006) Calcium Ion as a Second Messenger With Special Reference to Excitation-Contraction Coupling. *J. Pharmacol. Sci.* 100: 519-524.

Everts, M. E., Lomo, T. et Clausen, T. (1993) Changes in K^+ , Na^+ and calcium contents during in vivo stimulation of rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 147: 357-368.

Fénelon, K., Lamboley, C. R. H., Carrier, N. et Pape, P. C. (2012) Calcium buffering properties of sarcoplasmic reticulum and calcium-induced Ca^{2+} release during the quasi-steady level of release in twitch fibers from frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 140(4): 403-419.

Fernyhough, P. et Calcutt, N. A. (2010) Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell Calcium* 47: 130-139.

Forero, D. A., Casadesus, G., Perry, G. et Arboleda, H. (2006) Synaptic dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease: Emerging mechanisms. *J. Cell. Mol. Med.* 10 (3): 796-805.

Frederickson, C. J., Koh, J. Y. et Bush, A. I. (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 449-462.

Fukada, T., Yamasaki, S, Nishida, K, Murakami, M. et Hirano, T. (2011) Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16: 1123-1134.

Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R. et Gouaux, E. (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 448(10): 185-192.

Galluzzi, L., Blomgren, K. et Kroemer, G. (2009) Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 481-494.

Gareri, P., Mattace, R., Nava, F. et De Sarro, G. (1995) Role of Calcium in Brain Aging. *Gen. Pharmac.* 26(8): 1651-1657.

Geisler, M. W., Morgan, C. D., Covington, J. W. et Murphy, C. (1999) Neuropsychological Performance and Cognitive Olfactory Event-Related Brain Potentials in Young and Elderly Adults. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 21(1): 108-126.

Gillespie, M. J., Gordon, T. et Murphy, P. R. (1987) Motor Units and Histochemistry in Rat Lateral Gastrocnemius and Soleus Muscles: Evidence for Dissociation of Physiological and Histochemical Properties After Reinnervation. *Journal of Neurophysiology* 57(4): 921-937.

Gissel, H. et Clausen, T. (1999) Excitation-induced Ca^{2+} uptake in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 276(2): 331-339.

Glesby, M., Rosenmann, E., Nylén, E. G. et Wrogemann, K. (1988) Serum CK, calcium, magnesium, and oxidative phosphorylation in MDX mouse muscular Dystrophy. *Muscle & Nerve* 11: 852-856.

Gower-Winter, S. H. et Levenson, C. W. (2012) Zinc in the central nervous system: From molecules to behavior. *Biofactors* 38(3): 186-193.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. et Tsien, R. Y. (1985) A New Generation of Ca^{2+} Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *The Journal of Biological Chemistry* 260(6): 3440-3450.

Harrison, S. M., et Bers, D. M. (1987) The effect of temperature and ionic strength on the apparent Ca -affinity of EGTA and the analogous Ca -chelators BAPTA and dibromo-BAPTA. *Biochim. Biophys. Acta.* 925:133–143.

Ho, K. W., Heusner, W. W., Van Huss, J. et Van Huss, W. D. (1983) Postnatal muscle fibre histochemistry in the rat. /. *Embryol. exp. Morph.* 76: 37-49.

Hoffman, H. J., Ishii, E. K. et Macturk, R. H. (1998) Age-related changes in the prevalence of smell/taste problems among the United States adult population. Results of the 1994 disability supplement to the National Health Interview Survey (NHIS). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855: 716-722.

Huang, C. M., Brown, N. et Huang, R. H. (1999) Age-related changes in the cerebellum: parallel fibers. *Brain Research* 840: 148-152.

Hummel, T., Barza, S., Paulib E. et Kobala, G. (1998) Chemosensory event-related potentials change with age. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology* 108: 208-217.

Hwang, J. J., Lee, S. J., Kim, T. Y., Cho, J. H. et Koh, J. Y. (2008) Zinc and 4-Hydroxy-2-Nonenal Mediate Lysosomal Membrane Permeabilization Induced by H₂O₂ in Cultured Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 28(12): 3114-3122.

Hyrc, K., Handran, S. D., Rothman, S. M. et Goldberg, M. P. (1997) Ionized Intracellular Calcium Concentration Predicts Excitotoxic Neuronal Death: Observations with Low-Affinity Fluorescent Calcium Indicators. *The Journal of Neuroscience* 17(17): 6669-6677.

Hyun, H. J., Sohn, J. H., Ha, D. W., Ahn, Y. H., Koh, J. Y. et Yoon, Y. H. (2001) Depletion of Intracellular Zinc and Copper with TPEN Results in Apoptosis of Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42:460-465.

Isaacson, A. et Sandow, A. (1963) Effects of Zinc on Responses of Skeletal Muscle. *The Journal of General Physiology* 46: 655-677.

Jiang, D., Sullivan, P. G., Sensi, S. L., Steward, O. et Weiss, J. H. (2001) Zn²⁺ Induces Permeability Transition Pore Opening and Release of Pro-apoptotic Peptides from Neuronal Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 276(50): 47524-47529.

Koh, J. Y., Suh, S. W., Gwag, B. J., He, Y. Y., Hsu, C. Y. et Choit, D. W. (1996) The Role of Zinc in Selective Neuronal Death After Transient Global Cerebral Ischemia. *Science* 272: 1013-1016.

Krezel, A., Wojcik, J, Maciejczyk, M. et Bal, W. (2003) May GSH and L-His contribute to intracellular binding of zinc? Thermodynamic and solution structural study of a ternary complex. *Chem. Commun.* 6: 704-705.

Krezel, A. et Maret, W. (2006) Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11:1049-1062.

Kuchibhotla, K. V., Goldman, S. T., Lattarulo, C. R., Wu, H. Y., Hyman, B. T. et Bacskai B. J. (2008) A β Plaques Lead to Aberrant Regulation of Calcium Homeostasis In Vivo Resulting in Structural and Functional Disruption of Neuronal Networks. *Neuron* 59: 214-225.

Kuchibhotla, K. V., Lattarulo, C. R., Hyman, B. T. et Bacskai B. J. (2009) Synchronous Hyperactivity and Intercellular Calcium Waves in Astrocytes in Alzheimer Mice. *Science* 323: 1211-1215.

Lambole, C. R. H., Kake Guena, S. A., Touré, F., Hébert, C., Yaddaden, L., Nadeau, S., Bouchard, P., Wei-LaPierre, L., Lainé, J., Rousseau, E. C., Frenette, J., Protasi, F., Dirksen, R.T. et Pape, P. C. (2015) New method for determining total calcium content in tissue applied to skeletal muscle with and without calsequestrin. *J. Gen. Physiology* 145(2):127-153.

Larsson, M. et Backman, L. (1998) Modality Memory Across the Adult Life Span: Evidence for Selective Age-Related Olfactory Deficits. *Experimental Aging Research* 24: 63-82.

Lee, J. Y., Cole, T. B., Palmiter, R. D. et Koh, J. Y. (2000) Accumulation of zinc in degenerating hippocampal neurons of ZnT3-null mice after seizures: evidence against synaptic vesicle origin. *J. Neurosci.* 20 RC79.

Lee, J. M., Zipfel, G. J., Park, K. H., He, Y. Y., Hsu, C. Y. et Choi, D. W. (2002) Zinc translocation accelerates infarction after mild transient focal ischemia. *Neuroscience* 115(3): 871-878.

Lee, J. Y., Kim, J. H., Palmiter, R. D. et Koh, J. Y. (2003) Zinc released from metallothionein-III may contribute to hippocampal CA1 and thalamic neuronal death following acute brain injury. *Exp. Neurol.* 184: 337-347.

Lehrner, J. P., Gluck, J., Laska, M. (1999) Odor identification, consistency of label use, olfactory threshold and their relationships to odor memory over the human lifespan. *Chem. Senses* 24(3): 337-46.

Lessard-Beaudoin, M., Laroche, M., Demers, M. J., Grenier, G. et Graham, R. K. (2015) Characterization of age-associated changes in peripheral organ and brain region weights in C57BL/6 mice. *Experimental Gerontology* 63: 27-34.

Li, Y. V. (2012) Zinc overload in stroke. *Metal Ion in Stroke*. New York: Springer Science 167-189.

Lutz, G. J., Bremner, S., Lajevardi, N., Lieber, R. L. et Rome, L. C. (1998) Quantitative analysis of muscle fibre type and myosin heavy chain distribution in the frog hindlimb: implications for locomotory design. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 19: 717-731.

MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J. et Barker, J. L. (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321: 519-522.

MacLennan, D. H., et Wong, P. T. S. (1971) Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68 (6): 1231-1235.

Manno, C. et Rios, E. (2015) A better method to measure total calcium in biological samples yields immediate payoffs. *J. Gen. Physiol.* 145(3): 167-171.

Mantele, W. et Deniz, E. (2017) UV-VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 173: 965-968.

Marieb, E. N. et Hoehn, K. (2015) *Anatomie et physiologie humaines*. Montréal: ERPI (5^{ème} éd.).

McDonnell, A. F. & Pape, P. C. (2015) The concentration of total calcium in fast twitch and heart muscles from mice in an agitated and active state is almost two-fold greater than those from resting mice. *Biophysical Journal* 110(3). 60th Annual Meeting of the Biophysical Society, Los Angeles, California, United States (99a). *Abstract*.

Medvedeva, Y. V., Lin, B., Shuttleworth, C. W., et Weiss, J. H. (2009) Intracellular Zn²⁺ Accumulation Contributes to Synaptic Failure, Mitochondrial Depolarization, and Cell Death in an Acute Slice Oxygen–Glucose Deprivation Model of Ischemia. *The Journal of Neuroscience* 29(4): 1105-1114.

Milnerwood, A. J. et Raymond, L. A. (2010) Early synaptic pathophysiology in neurodegeneration: insights from Huntington's disease. *Trends in Neurosciences* 33(11): 513-523.

Mirich, J. M., Williams, N. C., Berlau, D. J. et Brunjes, P. C. (2002) Comparative Study of Aging in the Mouse Olfactory Bulb. *The Journal of Comparative Neurology* 454: 361-372.

Moberg, P. J. et Raz, N. (1997) Aging and Olfactory Recognition Memory: Effect of Encoding Strategies and Cognitive Abilities. *Intern. J. Neuroscience* 90(3-4): 217-292.

Mota, B. et Herculano-Houzel, S. (2014) All brains are made of this: a fundamental building block of brain matter with matching neuronal and glial masses. *Frontiers of Neuroanatomy* 8(127): 1-21.

Murphy, C., Wetter, S., Morgan, C. D., Ellison, D. W. et Geisler, M. W. (1998) Age Effects on Central Nervous System Activity Reflected in the Olfactory Event-Related Potential: Evidence for Decline in Middle Age. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855(1): 598-607.

Murphy, R. M., Larkins, N. T., Mollica, J. P., Beard, N. A. et Lamb, G. D. (2009) Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca^{2+} storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. *J. Physiol.* 587(2): 443-460.

Nishizawa, Y. (2001) Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sciences* 69: 369-381.

Nithianantharajah, J. et Hannan, A. J. (2013) Dysregulation Of Synaptic Proteins, Dendritic Spine Abnormalities And Pathological Plasticity Of Synapses As Experience-Dependent Mediators Of Cognitive And Psychiatric Symptoms In Huntington's Disease. *Neuroscience* 251: 66-74.

Nordin, S., Murphy, C., Davidson, T. M., Quinones, C., Jalowayski, A. A. et Ellison, D. W. (1996) Prevalence and Assessment of Qualitative Olfactory Dysfunction in Different Age Groups. *Laryngoscope* 106: 739-744.

Opazo, C., Luza, S., Victor L. V. L., Volitakis, I., Rowe, C., Barnham, K. Strozyk, D., Masters, C. L., Cherny R. A. et Bush, A. I. (2006) Radioiodinated clioquinol as a biomarker for β -amyloid: Zn^{2+} complexes in Alzheimer's disease. *Aging Cell* 5: 69-79.

Palmer, B. M., Vogt, S., Chen, Z., Lachapelle R. R. et LeWinter, M. M. (2006) Intracellular distributions of essential elements in cardiomyocytes. *Journal of Structural Biology* 155: 12-21.

Palmiter, R. D. (2004) Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *PNAS* 101(14): 4918-4923.

- Pape, P. C., Jong, D. S. et Chandler, W. K. (1995) Calcium Release and Its Voltage Dependence in Frog Cut Muscle Fibers Equilibrated with 20 mM EGTA. *J. Gen. Physiology* 106: 259-336.
- Pape, P. C., Fénelon, K., Lamboley, C. R. H. et Stachura, D. (2007) Role of calsequestrin evaluated from changes in free and total calcium concentrations in the sarcoplasmic reticulum of frog cut skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 581(1): 319-367.
- Paschen, W. (1996) Glutamate excitotoxicity in transient global cerebral ischemia. *Acta Neurobiol. Exp.* 56: 313-322.
- Peachey, L. D. et Huxley, A. F. (1962) Structural identification of twitch and slow striated muscle fibers of the frog. *J. Cell Biol.* 13: 177-180.
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H. et Ren, B. (2011) Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. *Mol. Biol. Rep.* 38: 453-460.
- Perez Velazquez, J. L., Frantseva, M. V. et Carlen, P. L. (1997) In Vitro Ischemia Promotes Glutamate-Mediated Free Radical Generation and Intracellular Calcium Accumulation in Hippocampal Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 17(23): 9085-9094.
- Pitt, S. J. et Stewart, A. J. (2015) Examining a new role for zinc in regulating calcium release in cardiac muscle. *Biochem. Soc. Trans.* 43: 359-363.
- Pousson, M., Pérot, C. et Goubel, F. (1991) Stiffness changes and fibre type transitions in rat soleus muscle produced by jumping training. *Pflügers Arch.* 419: 127-130.
- Qian, C. et Colvin, R. A. (2015) Zinc flexes its muscle: Correcting a novel analysis of calcium for zinc interference uncovers a method to measure zinc. *J. Gen. Physiology* 147(1): 95-102.

Raymond, L. A. (2017) Striatal synaptic dysfunction and altered calcium regulation in Huntington disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483: 1051-1062.

Rigoard, P., Buffenoir, K., Wager, M., Bauche, S., Giot, J. P. et Lapierre, F. (2009) Architecture moléculaire du réticulum sarcoplasmique et son rôle dans le couplage excitation-contraction. *Neurochirurgie* 55S: S83-S91.

Ritchie, C. W., Bush, A. I., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., MacGregor, L., Kiers, L., Cherny, R., Li, Q. X., Tammer, A., Carrington, D., Mavros, C., Volitakis, I., Xilinas, M., Ames, D., Davis, S., Beyreuther, K., Tanzi, R. E. et Masters, C. L. (2003) Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting A β amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch. Neurol.* 60(12): 1685-1691.

Rogers, J., Zornetzer, S. F., Bloom, F. E. et Mervis, R. E. (1984) Senescent Microstructural Changes in Rat Cerebellum. *Brain Research*, 292: 23-32.

Rolls, B. J. (1999) Do Chemosensory Changes Influence Food Intake in the Elderly? *Physiology & Behavior* 66(2): 193-197.

Schiffman, S. S. et Leffingwell, J. C. (1981) Perception of Odors of Simple Pyrazines by Young and Elderly Subjects: A Multidimensional Analysis. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 14: 787-798.

Schirinzi, T., Madeo, G., Martella, G., Maltese, M., Picconi, B., Calabresi, P. et Pisani, A. (2016) Early Synaptic Dysfunction in Parkinson's Disease: Insights From Animal Models. *Movement Disorders*, 31(6): 802-813.

Sensi, S. L., Ton-That, D., Sullivan, P. G., Jonas, E. A., Gee, K. R., Kaczmarek, L. K. et Weiss, J. H. (2003) Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn^{2+} pools. *PNAS* 100(10): 6157-6162.

Sensi, S. L., Paoletti, P., Bush, A. I. et Sekler, I. (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nature Reviews, Neuroscience* 10:780-792.

Sheline, C. T., Zhu, J., Zhang, W., Shi, C. et Cai, A. L. (2012) Mitochondrial Inhibitor Models of Huntington's Disease and Parkinson's Disease Induce Zinc Accumulation and Are Attenuated by Inhibition of Zinc Neurotoxicity in vitro or in vivo. *Neurodegener. Dis.* 11: 49-58.

Shepherd, G. M. (1972) Synaptic Organization of the Mammalian Olfactory Bulb. *Physiological Reviews* 52(4): 864-917.

Ship, J. A. et Weiffenbach, J. M. (1993) Age, Gender, Medical Treatment, and Medication Effects on Smell Identification. *Journal of Gerontology: Medical Sciences* 48(1): M26-M32.

Simons, T. J. B. (1988) Calcium and neuronal function. *Neurosurg. Rev.* 11: 119-129.

Smart, T. G., Hosie, A. M. et Miller, P. S. (2004) Zn^{2+} ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist* 10(5): 432-442.

Smith, J. L., Xiong, S., Markesbery, W. R. et Lovell, M. A. (2006) Altered Expression Of Zinc Transporters-4 And -6 In Mild Cognitive Impairment, Early And Late Alzheimer's Disease Brain. *Neuroscience* 140: 879-888.

Soukup, T., Zacharova, G. et Smerdu, V. (2002) Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta histochem.* 104(4): 399-405.

Stork, C. J. et Li, Y. V. (2006) Intracellular Zinc Elevation Measured with a “Calcium-Specific” Indicator during Ischemia and Reperfusion in Rat Hippocampus: A Question on Calcium Overload. *The Journal of Neuroscience* 26(41): 10430-10437.

Szydlowska, K. et Tymianski, M. (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47: 122-129.

Tonder, N., Johanse,, F. F., Frederickson, C. J., Zimmer, J. et Diemer, N. H. (1990) Possible role of zinc in the selective degeneration of dentate hilar neurons after cerebral ischemia in the adult rat. *Neuroscience Letters* 109: 247-252.

Tsai, S. J., Hong, C. J., Liu, H. C., Liu, T. Y., Hsu, L. E. et Lin, C. H. (2004) Association Analysis of Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met Polymorphisms with Alzheimer’s Disease and Age of Onset. *Neuropsychobiology* 49: 10-12.

Tsien, R. Y. (1980) New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures. *Biochemistry*, 19(11): 2396-2404.

Tsien, R. Y., Pozzan, T. et Rink, T. J. (1982) Calcium Homeostasis in Intact Lymphocytes: Cytoplasmic Free Calcium Monitored With a Intracellularly Trapped Fluorescent Indicator. *The Journal of Cell Biology* 94: 325-334.

Tuncay, E., Bilginoglu, A., Sozmen, N. N., Zeydanli, E. N., Ugur1, M., Vassort, G. et Turan, B. (2011) Intracellular free zinc during cardiac excitation-contraction cycle: calcium and redox dependencies. *Cardiovascular Research* 89: 634-642.

Tyagi, S., Beqollari, D., Lee, C. S., Walker, L. A. et Bannister, R. A. (2017) Semi-automated Analysis of Mouse Skeletal Muscle Morphology and Fiber type Composition. *Journal of Visualized Experiments* 126: e56024.

Vesely, M. J. J., Sanders, R., Green, C. J. et Motterlini, R. (1999) Fibre type specificity of haem oxygenase-1 induction in rat skeletal muscle. *FEBS Letters* 458: 257-260.

Walhovd, K. B., Westlye, L. T., Amlien, I., Espeseth, T., Reinvang, I., Razc, N., Agartz, I., Salat, D. H., Greve, D. N., Fischl, B., Dale, A. M. et Fjell A. M. (2011) Consistent neuroanatomical age-related volume differences across multiple samples. *Neurobiology of Aging* 32: 916-932.

White, L. D. et Barone, S. (2001) Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. *Cell Death and Differentiation* 8: 345-356.

Woods, N. K. et Padmanabhan, J. (2012) Neuronal calcium signaling and Alzheimer's disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 1193-1217.

Yamada, K., Noda, Y., Komori, Y., Sugihara, H., Hasegawa, T. et Nabeshima, T. (1996) Reduction in the number of NADPH-diaphorase-positive cells in the cerebral cortex and striatum in aged rats. *Neuroscience Research* 24: 393-402.

Yamasaki, S., Sakata-Sogawa, K., Hasegawa, A., Suzuki, T., Kabu, K., Sato, E., Kurosaki, T., Yamashita, S., Tokunaga, M., Nishida, K. et Hirano, T. (2007) Zinc is a novel intracellular second messenger. *The Journal of Cell Biology* 177 (4): 637-645.

Yang, M. S. et Wong, M. H. (2001) Changes in Ca, Cu, Fe, Mg, and Zn Contents in Mouse Brain Tissues After Prolonged Oral Ingestion of Brick Tea Liquor Containing a High Level of Al. *Biological Trace Element Research* 80:67-76.

Yin, H. Z., Sensi, S. L., Ogoshi, F. et Weiss, J. H. (2002) Blockade of Ca^{2+} -Permeable AMPA/Kainate Channels Decreases Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Zn^{2+} Accumulation and Neuronal Loss in Hippocampal Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 22(4): 1273-1279.

Yoshida, M., Yonetani, A., Shirasaki, T. et Wada, K. (2006) Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290: R449-R455.

Zhang, L., Kokkonen, G. et Roth, G. S. (1995) Identification of neuronal programmed cell death in situ in the striatum of normal adult rat brain and its relationship to neuronal death during aging. *Brain Research* 677: 177-179.

Zhang, L. H., Wang, X., Zheng, Z. H., Rena, H., Stoltenberg, M., Danscher, G., Huang, L., Ronga, M. et Wang, Z. Y. (2008) Altered expression and distribution of zinc transporters in APP/PS1 transgenic mouse brain. *Neurobiology of Aging* 31: 74-87.